



HAL
open science

Ingénierie tissulaire du ligament : association de copolymères dégradables et de cellules souches mésenchymateuses

Adrien Leroy

► **To cite this version:**

Adrien Leroy. Ingénierie tissulaire du ligament : association de copolymères dégradables et de cellules souches mésenchymateuses. Matériaux. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2013. Français. NNT : 2013MON20114 . tel-01022842

HAL Id: tel-01022842

<https://theses.hal.science/tel-01022842>

Submitted on 11 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l' **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale n°168
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé – CBS²

Et des unités de recherche
Institut des Biomolécules Max Mousseron - UMR CNRS 5247
INSERM U844

Formation doctorale : **Biologie - Santé**
Spécialité : Chimie des matériaux

Présentée par **Adrien LEROY**

INGENIERIE TISSULAIRE DU LIGAMENT

Association de copolymères dégradables et de
cellules souches mésenchymateuses

Soutenue le 12 décembre 2013 devant le jury composé de

Jean COUDANE	Professeur	Université Montpellier 1	Co-directeur
Xavier GARRIC	Professeur	Université Montpellier 1	Invité
Didier LETOURNEUR	DR1	CNRS	Rapporteur
Claudia MONTEIRO-MENEI	MCU	Université d'Angers	Examinatrice
Danièle NOEL	DR2	Inserm	Co-directrice
Benjamin NOTTELET	MCU	Université Montpellier 1	Examineur
Jean-Luc SIX	Professeur	Université de Lorraine	Rapporteur

A la mémoire de Xavier Dumont

" Je sais pourquoi tant de gens aiment couper du bois. C'est une activité où l'on voit tout de suite le résultat. "

Albert Einstein, 1879 - 1955

GLOSSAIRE

Abréviations

β -GP	β -glycérophosphate
AA	Acide ascorbique
AGM	Artère géniculée médiane
AM	Faisceau antéromédial du LCA
APTS	Acide paratoluènesulfonique
ARN	Acide ribonucléique
BA	2,6-bis(4-azidobenzylidène)-4-méthylcyclohexanone
CSE	Cellules souches embryonnaires
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
DCM	Dichlorométhane
DIDT	Droit interne et demi tendineux
DMA	Analyse mécanique dynamique (<i>Dynamic Mechanical Analysis</i>)
DMEM	Milieu de culture cellulaire (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOSY	Technique de RMN 2D basée sur le coefficient d'auto-diffusion (<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>)
DPBS	Tampon phosphate salin (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
DSC	Analyse enthalpique différentielle (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)

GAG	Glycosaminoglycane
GPC	Chromatographie par perméation de gel (<i>Gel Permeation Chromatography</i>)
IBMM	Institut des Biomolécules Max Mousseron
IBMM-BA	Département Biopolymères Artificiels de l'IBMM (anciennement CRBA)
INM	Institut des Neurosciences de Montpellier
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
LCA	Ligament croisé antérieur
LDA	Diisopropylamide de lithium (<i>Lithium Diisopropyl Amide</i>)
MCF	Microscopie confocale à fluorescence
MEB	Microscope électronique à balayage
MEC	Matrice extra-cellulaire
PA	Pluronic azidé
PBS	Tampon phosphate salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PE	Polyéthylène
PEG	Poly(éthylène glycol)
PET	Poly(téréphtalate d'éthylène)
PETMP	Pentaérythritoltetrakis-(3 mercaptopropionate)
PGA	Polyglycolide
PHA	Polyhydroxyalcanoate
PHB	Poly(3-hydroxybutyrate)
PHV	Poly(3-hydroxyvalérate)

PL	Faisceau postérolatéral du LCA
PLA	Poly lactide
PDLA	Poly(D-lactide)
PDLLA	Poly(D,L-lactide)
PLCL	Poly(lactide-co- ϵ -caprolactone)
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
PLLA	Poly(L-lactide)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
POC	Polymérisation par ouverture de cycle
POCI	Mécanisme de polymérisation POC par coordination/insertion
PP	Polypropylène
PPG	Poly(propylène glycol)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PU	Polyuréthane
PUU	Poly(uréthane-urée)
RI	Indice de réfraction
RT-qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative après transcription inverse (<i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RMN	Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire
SIS	Sous-muqueuse de l'intestin grêle (<i>Small Intestine Submucosa</i>)
SVF	Sérum de veau fœtal
TA	Tetronic azidé
TCPS	Polystyrène traité pour la culture cellulaire (<i>Tissue Culture PolyStyrene</i>)

TGA	Analyse thermogravimétrique (<i>ThermoGravimetric Analysis</i>)
THF	Tétrahydrofurane
TPE	Elastomère thermoplastique (<i>Thermo Plastic Elastomers</i>)
TR	Tendon rotulien
ULA	Polystyrène à très faible adhésion cellulaire (<i>Ultra Low Attachment</i>)

Notations

ΔC_p	Variation de capacité calorifique
ΔH_f	Enthalpie de fusion
ε	Déformation
ε_r	Déformation à la rupture
ε_y	Déformation à la limite d'élasticité
σ	Contrainte
σ_r	Contrainte de rupture
σ_y	Limite d'élasticité ou seuil de plasticité (<i>yield strength</i>)
\mathcal{D}	Dispersité des masses molaires
E	Module d'Young (ou module d'élasticité)
\overline{Mn}	Masse molaire moyenne en nombre
\overline{Mw}	Masse molaire moyenne en masse
T_f	Température de fusion
T_g	Température de transition vitreuse
\overline{Xn}	Degré de polymérisation

SOMMAIRE

GLOSSAIRE.....	1
TABLE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	13
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	23
1. Les ligaments et tendons	23
1.1. Constitution des tissus.....	23
1.1.1. Cellules constitutives.....	24
1.1.2. Matrice extracellulaire.....	26
1.2. Anatomie et propriétés	29
1.2.1. Anatomie du genou	29
1.2.2. Anatomie du LCA	30
1.2.3. Propriétés mécaniques du LCA.....	31
1.3. Pathologies et traitements	34
1.3.1. Généralités.....	34
1.3.2. Rupture et réparation du LCA.....	36
2. Biomatériaux et ingénierie tissulaire	38
2.1. Concepts et définitions.....	39
2.1.1. L'ingénierie tissulaire.....	39
2.1.2. Les biomatériaux	40
2.2. Catégories et applications des biomatériaux.....	42
2.2.1. Biomatériaux métalliques.....	42
2.2.2. Biomatériaux céramiques.....	43
2.2.3. Biomatériaux d'origine naturelle	43
2.2.4. Biomatériaux polymères synthétiques	44
2.3. PLA et PCL : synthèse et propriétés	47
2.3.1. Synthèse	47
2.3.2. Propriétés.....	49
2.3.3. Dégradation	50

3. L'ingénierie tissulaire du ligament	52
3.1. Les matériaux des matrices de régénération	53
3.1.1. Matériaux biologiques	53
3.1.2. Polymères d'origine naturelle	55
3.1.3. Polymères synthétiques biorésorbables	59
3.2. Les architectures des matrices de régénération	62
3.2.1. Architectures textiles	62
3.2.2. Autres procédés	66
3.3. Les sources cellulaires	67
3.3.1. Fibroblastes	68
3.3.2. Cellules souches	68
3.4. Les modes de stimulation	71
3.4.1. Stimulations biochimiques	71
3.4.2. Stimulations mécaniques	73
3.5. Conclusions	75
4. Les élastomères dégradables pour l'ingénierie tissulaire	76
4.1. Elastomères thermoplastiques	78
4.2. Elastomères thermodurcissables	81
5. Bilan et cadre de la thèse	84
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	89
1. Thermoplastiques	89
1.1. Synthèse des copolymères de PLA	89
1.2. Mise en œuvre des polymères	91
1.3. Etude de dégradation	92
2. Elastomères réticulés	93
2.1. Réticulation par voie nitrène	93
2.1.1. Synthèse des polymères	93
2.1.2. Agents de réticulation azidés	94
2.1.3. Procédé de réticulation	96
2.2. Réticulation par voie thiol-yne	97
2.2.1. Propargylation de la PCL	97
2.2.2. Procédé de réticulation	98

2.3. Evaluation de la réticulation	99
3. Biologie cellulaire	99
3.1. Culture cellulaire.....	99
3.2. Cytocompatibilité.....	100
3.3. Tests de différenciation	103
4. Caractérisations et appareillages.....	106
4.1. Caractérisations chimiques	106
4.2. Caractérisations thermiques et mécaniques	106
4.3. Caractérisations biologiques	107
CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE BIOMATERIAUX POLYMERES DEGRADABLES	113
1. Copolymères thermoplastiques.....	113
1.1. Synthèse et essais préliminaires	113
1.1.1. Synthèse et propriétés.....	113
1.1.2. Propriétés mécaniques.....	117
1.2. Etude de dégradation.....	121
1.2.1. Synthèse et propriétés.....	121
1.2.2. Prise d'eau et perte de masse.....	122
1.2.3. Evolution de la masse molaire	124
1.2.4. Evolution des propriétés thermiques	125
1.2.5. Evolution des propriétés mécaniques	127
1.3. Conclusions.....	130
2. Elastomères dégradables	131
2.1. Réticulation par voie nitrène	131
2.1.1. Synthèse des agents de réticulation	133
2.1.2. Réticulation	136
2.2. Réticulation par voie thiol-yne.....	143
2.2.1. Synthèse de la PCL propargylée	145
2.2.2. Réticulation	149
3. Conclusions	156

CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT DE LA MATRICE DE REGENERATION LIGAMENTAIRE.....	161
1. Mise en œuvre textile.....	161
1.1. Caractérisation des fibres	161
1.2. Caractérisation de la matrice textile.....	164
2. Cytocompatibilité	168
2.1. Avant mise en forme	168
2.2. Après mise en forme	171
3. Différenciation cellulaire	175
3.1. Mise en place du modèle de différenciation	175
3.2. Différenciation sur les matrices de régénération.....	181
4. Conclusions	184
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	189
ANNEXES.....	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207

TABLE DES FIGURES

Figure I-1: Fibroblastes observés en microscopie optique en culture (A) et en coupe histologique de tendon (B)(extrait de odec.ca et de biodidac.bio.uottawa.ca)	24
Figure I-2 : Interaction fibroblastes - faisceaux de fibres de collagène [15]	25
Figure I-3 : Chondrocytes observés en microscopie optique en culture (A) et en coupe histologique de fibrocartilage (B)(extrait de bcr.uoguelv.ca et de studyblue.com)	25
Figure I-4 : Structure en triple hélice du tropocollagène (extrait de www.ebi.ac.uk)	26
Figure I-5 : Structure des ligaments et tendons (extrait de sportscoprsetbienetre.webnode.fr)	27
Figure I-6 : Coupes histologiques de tendon (A) et de ligament (B) (extrait de www.db-gersite.com) et fibres de collagène observées au MEB (C) [22].....	28
Figure I-7 : Structures d'une fibre élastique (A) [23] et de l'élastine (B) [19]	28
Figure I-8:Planche anatomique du genou (jambe droite) [24].....	29
Figure I-9 : Anatomie du genou (jambe gauche) avec mise en évidence des faisceaux du LCA (noté ici ACL) (extrait de ortho.medicine.pitt.edu).....	31
Figure I-10 : Courbe déformation-contrainte des ligaments et tendons [33].....	32
Figure I-11 : Les trois phases de la cicatrisation des ligaments et tendons (adapté de [45, 46])	35
Figure I-12 : Modes de rupture du LCA [39]:hypertorsion (A), hyperextension (B), hyperflexion (C), choc latéral (D).....	36
Figure I-13 : Principe général de l'ingénierie tissulaire [53].....	40
Figure I-14 : Prothèse d'orteil découverte en Egypte près de Louxor [56]	42
Figure I-15 : Synthèses et structures du PLA	48
Figure I-16 : Polymérisation par ouverture de cycle de lactones.....	48
Figure I-17 : Evolution des propriétés d'un polymère au cours de la dégradation hydrolytique [84] ..	51
Figure I-18 : Modes de dégradation des polymères dégradables : érosion en surface (a), dégradation en masse (b), et dégradation en masse avec autocatalyse (c) [84]	51
Figure I-19 : Cellules souches sur une matrice en soie tricotée observées en MCF [142]	59
Figure I-20 : Corde constituée de 540 fibres de soie obtenue par torsadage [18].....	63
Figure I-21 : Matrice ligamentaire en soie tricotée [129]	64
Figure I-22 : Matrice ligamentaire hétérogène en PLA tressé [167]	65
Figure I-23 : Matrices ligamentaires en PLA en tresse (a) torsade (b) et combinaison tresse-torsade (c) [152]	66
Figure I-24 : Observation au MEB de cellules souchesensemencées sur une matrice electrospinning [128].....	67
Figure I-25 : Processus de différenciation des CSM [187].....	69

Figure I-26 : Observation en MCF (filaments d'actine en rouge et noyaux en bleu) de fibroblastes non stimulés (a) et stimulés mécaniquement (b) (barre d'échelle : 10 μm) [209].....	74
Figure I-27 : Bioréacteur Bose® ElectroForce 5200 Biodynamic.....	75
Figure I-28 : Obtention d'un élastomère par création de ponts de réticulation	77
Figure I-29 : Principe de l'extension de chaîne appliqué à un PU [218]	80
Figure I-30 : Synthèse d'une structure réticulée à partir d'acide sébacique et d'un triol [218].....	81
Figure I-31 : Structure des agents de réticulation TT (à gauche) et PETAE (à droite).....	82
Figure I-32 : Elastomères obtenus par réticulation de PLA-PEG-PLA	84
Figure I-33 : Structures du Pluronic F-127 et du Tetronic 1107.....	85
Figure II-1 : 2,6-bis(4-azidobenzylidène)-4-méthylcyclohexanone	94
Figure II-2 : Acide azidobenzoïque (à gauche), DCC (au milieu) et DMAP (à droite).....	95
Figure II-3 : Schéma réactionnel de l'estérification de Steglich.....	95
Figure II-4 : Montage de la réaction de propargylation de la PCL	97
Figure II-5 : Boucle de matrice textile.....	105
Figure II-6 : Dispositif de stimulation mécanique cyclique.....	105
Figure III-1 : Spectre RMN ^1H du copolymère 94P100	114
Figure III-2 : Chromatogramme GPC du copolymère 94P100.....	114
Figure III-3 : Spectre RMN DOSY du copolymère 94P100.....	115
Figure III-4 : Thermogrammes DSC des copolymères P100.....	116
Figure III-5 : Profils déformation-contrainte en traction des copolymères P100	117
Figure III-6 : Profils déformation-contrainte en traction des copolymères T120 secs et à température ambiante (A) et hydratés à 37 °C (B)	119
Figure III-7 : Evolution de la prise d'eau des copolymères pendant la dégradation	123
Figure III-8 : Evolution de la masse molaire des copolymères pendant la dégradation	125
Figure III-9 : Thermogrammes du copolymère 96P200 pendant la dégradation (2 nd e montée en température).....	126
Figure III-10 : T_g des copolymères en fonction du temps de dégradation	127
Figure III-11 : Evolution des propriétés mécaniques des copolymères pendant la dégradation : module d'Young E (A), limite d'élasticité σ_y (B), déformation à la limite d'élasticité ε_y (C), contrainte de rupture σ_r (D), déformation de rupture ε_r (E).....	129
Figure III-12 : Réactivité photochimique des azotures de phényle [265].....	132
Figure III-13 : Schéma réactionnel de la réticulation de chaînes polyesters par un polyazoture.....	132
Figure III-14 : Spectres IRTF de l'acide azidobenzoïque et de l'ester formé avec le glycérol	133
Figure III-15 : Spectre RMN ^1H du Tetronic azidé	134

Figure III–16 : Spectre DOSY du Tetronic azidé.....	134
Figure III–17 : Chromatogrammes GPC du Pluronic et du Tetronic	135
Figure III–18 : Chromatogrammes GPC des mélanges polymère-réticulant après irradiation UV.....	136
Figure III–19 : Structure chimique des copolymères thermoplastiques (à gauche) et des copolymères réticulés (à droite).....	137
Figure III–20 : Films PLA + TA avant et après irradiation UV	138
Figure III–21 : Réticulation des PLA en fonction de la concentration en réticulant TA.....	139
Figure III–22 : Enthalpie de fusion du PLA en fonction de la concentration en Tetronic ou TA	140
Figure III–23 : Déformation à la limite d'élasticité ε_y des films PLA + TA avant et après irradiation.....	141
Figure III–24 : Modification anionique de la PCL avec divers groupes substituants [273].....	143
Figure III–25 : Schéma réactionnel de la propargylation de la PCL	144
Figure III–26 : Réticulation de la PCL propargylée par le PETMP	145
Figure III–27 : Spectre RMN ^1H de la PCL propargylée	146
Figure III–28 : Chromatogrammes et propriétés mesurées par GPC de la PCL et de la PCL propargylée	147
Figure III–29 : Spectre DOSY de la PCL propargylée.....	148
Figure III–30 : Réticulation de la PCL en fonction de la proportion de PCL propargylée	150
Figure III–31 : Architecture du mélange de PCL et de PCL propargylée réticulée	151
Figure III–32 : Gonflement de la fraction réticulée en fonction de la proportion de PCL propargylée	152
Figure III–33 : Thermogrammes TGA de la PCL, de la PCL propargylée, et de PCL réticulées.....	152
Figure III–34 : Caractéristiques de la fusion de la PCL propargylée avant et après réticulation	153
Figure III–35 : Propriétés mécaniques des PCL réticulées : module d'Young E (A), limite d'élasticité σ_y (B), déformation à la limite d'élasticité ε_y (C), contrainte de rupture σ_r (D), déformation de rupture ε_r (E)	154
Figure IV–1 : Observation au microscope de fibres extrudées de 94T200 (filière 750 μm) grossissement $\times 10$ (A) et $\times 40$ (B)	162
Figure IV–2 : Observation au microscope d'une matrice textile préparée par torsadage et tressage..	164
Figure IV–3 : Courbe déformation-force d'une matrice textile	164
Figure IV–4 : Evolution de la déformation d'une matrice textile 94P200 sollicitée cycliquement	167
Figure IV–5 : Evolution du module d'Young d'une matrice textile 94P200 sollicitée cycliquement	168
Figure IV–6 : Prolifération in vitro des cellules C3 sur différents polymères (test PrestoBlue).....	169
Figure IV–7 : Observation par MCF de cellules C3 après 7 jours de culture sur 94P200 (A, B) et 94T200 (C, D) et marquage Live/Dead – cellules vivantes en vert (A, C) et mortes en rouge (B, D)	170

Figure IV–8 : Observation de cellules C3 en présence de microfibrilles par microscopie optique en lumière blanche (A, C) et en fluorescence (B, D)	171
Figure IV–9 : Prolifération in vitro des cellules C3 sur les matrices textiles (test PrestoBlue) exprimée en unité arbitraire (A) et en unité arbitraire / cm ² (B)	173
Figure IV–10 : Observation par MCF de cellules C3 après 10 jours de culture sur une matrice textile et marquage Live/Dead – cellules vivantes en vert (A) et mortes en rouge (B), autofluorescence du polymère en bleu (C).....	174
Figure IV–11 : Reconstitution 3D par MCF d’une portion de matrice textile (bleu)ensemencée avec des cellules C3 marquées Live/Dead (vert/rouge).....	174
Figure IV–12 : Observation au microscope de cellules C3 traitées BMP-2 (A) et BMP-12 (B)	176
Figure IV–13 : Effets des traitements BMP-2 et BMP-12 sur l’expression par les cellules C3 de marqueurs de différenciation.....	177
Figure IV–14 : Effets du traitement AA + β -GP sur l’expression des marqueurs de différenciation par les cellules C3 et B6	179
Figure IV–15 : Effets du traitement AA + β -GP et de la densité d’ensemencement sur l’expression des marqueurs de différenciation par les cellules C3.....	180
Figure IV–16 : Effets de la densité d’ensemencement, de la nature du support cellulaire et de la stimulation mécanique sur l’expression des marqueurs de différenciation par les cellules C3.....	182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 :Composition des ligaments et tendons [1-8].....	23
Tableau I-2 : Propriétés mécaniques en traction uniaxiale du LCA humain [30].....	33
Tableau I-3 : Propriétés du LCA humain et de ligaments artificiels [42-44]	38
Tableau I-4 : Exemples de biomatériaux polymères biostables.....	45
Tableau I-5 : Principaux polyesters aliphatiques	46
Tableau I-6 : Propriétés thermiques et mécaniques du PLA et de la PCL [71-73, 75-77]	50
Tableau I-7 : Propriétés mécaniques de fibres de collagène de type I après réticulation [106].....	56
Tableau I-8 : Propriétés mécaniques de la soie [118].....	57
Tableau I-9 : Propriétés des structures textiles [105].....	63
Tableau I-10 : Principales familles de facteurs de croissance utilisés en ingénierie tissulaire du ligament [4, 11, 148, 183]	72
Tableau I-11 : Exemples de copolymères TPE [224, 225]	80
Tableau I-12 : Exemples de polyesters à base de polyols et d'acide sébacique [216].....	82
Tableau II-1 : Composition des copolymères utilisés lors de l'étude préliminaire	90
Tableau II-2 : Composition des copolymères utilisés lors des tests de dégradation.....	91
Tableau II-3 : Conditions des tests de prolifération PrestoBlue	102
Tableau II-4 : Traitements BMP appliqués aux CSM pour induire la différenciation	103
Tableau II-5 : Séquences d'amorces de RT-qPCR pour les gènes de souris (<i>Mus musculus</i>)	109
Tableau III-1 : Propriétés des copolymères P100 et T120.....	116
Tableau III-2 : Propriétés mécaniques des copolymères P100 préparés par évaporation de solvant et par moulage (tests sur échantillons secs et à température ambiante)	118
Tableau III-3 : Propriétés mécaniques des copolymères T120 préparés par moulage (secs à température ambiante et hydratés à 37°C).....	120
Tableau III-4 : Propriétés des copolymères P100, T100, P200 et T200	122
Tableau III-5 : Exemples de propriétés de PCL propargylées.....	149
Tableau IV-1 : Propriétés mécaniques des copolymères avant et après extrusion	162
Tableau IV-2 : Masses molaires et propriétés thermiques des copolymères avant et après extrusion	163
Tableau IV-3 : Propriétés mécaniques des copolymères avant et après torsadage et tressage	165

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Au sein du système musculo-squelettique, ligaments et tendons jouent un rôle essentiel dans le corps humain. En assurant les liaisons os-os et os-muscle ainsi que la transmission des forces au sein de ce système, ils garantissent la mobilité et la stabilité des articulations. Le genou illustre parfaitement la nécessité de ces tissus conjonctifs : les quatre ligaments qui le constituent ont chacun des fonctions bien particulières, l'ensemble étant censé éviter les mouvements extrêmes de l'articulation et les blessures associées comme les luxations.

En raison d'une activité sportive croissante d'une partie de la population et notamment de sports traumatiques tels que le football ou le ski, on a assisté ces dernières décennies à une augmentation du nombre de blessures des articulations et notamment de lésions du ligament croisé antérieur du genou (LCA). On recense en effet près de 36 000 réparations chirurgicales du LCA en France chaque année et plus de 200 000 aux Etats-Unis. Le traitement des ruptures du LCA a connu d'importantes évolutions au cours des décennies, des premières tentatives de suture rapportées en 1903 en passant par l'échec des ligaments artificiels très employés dans les années 1980-90 comme prothèses de remplacement définitives. Les chirurgiens orthopédiques s'appuient désormais essentiellement sur des techniques d'autogreffes réalisées sous arthroscopie [1, 2].

Malgré l'efficacité de ces traitements chirurgicaux (résultats satisfaisants dans 70 à 90% des cas selon la technique utilisée), certains inconvénients subsistent (douleurs résiduelles dues au prélèvement du greffon, défaut de fixation du greffon) et leur coût élevé (en moyenne 2300 € en Europe et 4100 \$ aux Etats-Unis) a fait des ruptures du LCA un problème de santé publique coûtant près d'un milliard de dollars par an aux Etats-Unis [2-4].

La recherche d'alternatives aux traitements actuels et le développement des connaissances dans les domaines des biomatériaux et de la biologie cellulaire (notamment des cellules souches) a poussé la communauté scientifique à rechercher et développer de nouveaux moyens de régénération des ligaments grâce à une toute jeune discipline : l'ingénierie tissulaire.

A l'interface de la chimie et de la biologie, l'ingénierie tissulaire s'appuie sur l'association de supports de régénération, les "matrices" ou "*scaffolds*", et de différents types cellulaires dans le but de réparer, reconstituer ou régénérer des tissus ou organes lésés [5, 6]. Contrairement aux prothèses inertes classiques utilisées actuellement, l'ingénierie tissulaire vise à développer de nouveaux types de prothèses bioactives non plus limitées à un rôle palliatif mais désormais capables de conduire à la reformation des tissus. Pour parvenir à ce résultat, il y a toutefois un long chemin à parcourir et de nombreux paramètres à contrôler. Synthétiser un matériau et le mettre en œuvre de manière à obtenir une matrice de régénération qui sera non seulement tolérée par l'organisme mais permettra voire favorisera la réaction cellulaire appropriée et la régénération tissulaire pour ensuite être éliminée de l'organisme, connaître et maîtriser cette réaction cellulaire et particulièrement la différenciation de cellules souches idéalement directement prélevables à partir du patient à traiter : tels sont les défis à relever afin de parvenir à faire de l'ingénierie tissulaire une réalité.

La réparation des ligaments et plus particulièrement celle du LCA est une des applications parmi les plus étudiées actuellement dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. Reposant bien souvent sur la conception de matrices de régénérations textiles et la culture de cellules souches, l'ingénierie tissulaire du LCA est soumise à un cahier des charges particulièrement vaste. Outre l'évidente nécessité de biocompatibilité de la matrice de régénération, celle-ci doit également être capable de remplir la fonction du LCA au cours de la reformation des tissus, ce qui implique des spécifications mécaniques bien particulières. De plus, elle doit également permettre aux cellules utilisées de la coloniser et de constituer une structure tissulaire menant à un nouveau ligament fonctionnel.

C'est avec le désir de mener un tel projet qu'est née cette thèse, fruit d'une collaboration entre deux laboratoires montpelliérains :

- le département **Biopolymères Artificiels** de l'**Institut des Biomolécules Max Mousseron** (IBMM, UMR CNRS 5247), notamment spécialisé dans la synthèse et l'étude de polymères dégradables pour des applications biomédicales
- le groupe **Cellules souches mésenchymateuses et réparation du cartilage** de l'unité **Cellules Souches Mésenchymateuses, Environnement Articulaire et Immunothérapies de la Polyarthrite Rhumatoïde** (INSERM U844).

L'objectif de ce projet pluridisciplinaire a été de réunir les compétences en chimie des matériaux polymères et en biologie cellulaire de ces deux laboratoires afin de développer un prototype de matrice de régénération ligamentaire dégradable répondant au cahier des charges évoqué précédemment et d'employer cette matrice comme support cellulaire pour la prolifération et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses. L'une des particularités de ce projet a été la volonté d'aborder tous les aspects de l'ingénierie tissulaire du ligament : la synthèse du matériau, sa mise en œuvre et sa caractérisation, ainsi que l'aspect biologique comportant notamment les travaux sur la différenciation cellulaire. Afin de rendre compte des travaux effectués dans le cadre de ce projet, ce mémoire de thèse s'articulera en quatre parties.

Le premier chapitre sera une **étude bibliographique** consacrée tout d'abord aux ligaments et tendons avec un accent particulier sur les caractéristiques et propriétés du LCA ainsi qu'à ses techniques de réparation. Après avoir présenté les concepts de biomatériaux et d'ingénierie tissulaire et évoqué deux des principaux polymères dégradables utilisés dans le domaine biomédical, le polylactide et la poly(ϵ -caprolactone), nous ferons un état des lieux des travaux d'ores et déjà décrits dans la littérature sur l'ingénierie tissulaire du ligament.

Après avoir détaillé nos **méthodes expérimentales** dans un deuxième chapitre, nous présenterons les résultats obtenus au cours de ce projet dans deux chapitres distincts. Le troisième chapitre sera tout d'abord consacré au **développement et à l'étude de nouveaux biomatériaux dégradables** en vue d'une application pour la régénération ligamentaire. Plusieurs stratégies y seront décrites : la préparation de copolymères à blocs thermoplastiques à base de polylactide puis la synthèse de structures plus originales, des élastomères dégradables aux propriétés élastiques améliorées obtenus par réticulation photochimique de polylactide ou de poly(ϵ -caprolactone).

Enfin, le quatrième et dernier chapitre traitera du **développement et de l'étude d'une matrice de régénération ligamentaire** préparée grâce à des techniques de mise en œuvre textile à partir de copolymères sélectionnés dans la partie précédente. L'étude biologique menée sur des cellules souches mésenchymateuses et notamment les tests de cytocompatibilité avec nos matériaux ainsi que les travaux sur la différenciation ligamentaire constitueront les derniers sujets abordés et l'aboutissement de ce projet.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les ligaments et tendons

1.1. Constitution des tissus

Les ligaments et les tendons font partie des tissus conjonctifs fibreux, les tissus les plus abondants du corps humain qui, comme leur nom l'indique, ont pour fonction de lier des parties du corps (respectivement os-os et os-muscle). Dans le cas particulier des ligaments et des tendons, il s'agit de tissus denses formés d'un réseau cellulaire tridimensionnel de fibroblastes (parfois appelés respectivement ligamentocytes et ténocytes) qui occupent environ 20 % du volume tissulaire et sont entourés d'une structure de macromolécules et d'eau, la matrice extracellulaire (MEC), produite par ces cellules et qui occupe les 80 % restant.

Ces tissus sont essentiellement constitués d'eau, de différents types de collagènes (notamment types I, III et V), d'élastine, de protéoglycanes qui résultent de la combinaison d'une protéine et d'un glycosaminoglycane (GAG), et de glycoprotéines. Les quantités relatives de ces différents éléments varient selon la nature du tissu (ligament ou tendon) (*Tableau I-1*) et même entre les différents ligaments et tendons, par exemple entre le tendon rotulien et le tendon d'Achille.

Tissus	Ligaments	Tendons
Fonction	liaison os-os	liaison os-muscle
Eau	60 – 70 % de la masse humide	60 – 80 % de la masse humide
Collagène	75 – 80 % de la masse sèche	85 – 90 % de la masse sèche
dont type I	70 – 90 %	>95 %
dont type III	8 – 12 %	< 5 %
autres types	II, V (jusqu'à 12 %), IX, X, XI, XII, XIV	
Elastine	< 5%	2 %
Protéoglycanes	~ 1 %	1 – 5 %
Glycoprotéines	< 1 %	

Tableau I-1 :Composition des ligaments et tendons [7-14]

1.1.1. Cellules constitutives

Les fibroblastes, responsables de la sécrétion et du renouvellement de la MEC en général et des collagènes en particulier, sont les principales cellules constituant les ligaments et les tendons ainsi que la plupart des autres tissus conjonctifs. Les fibroblastes sont des cellules provenant de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et caractérisées par leur morphologie fusiforme due à de longs prolongements cytoplasmiques (**Figure I-1**). Leurs dimensions sont généralement comprises entre 20 et 70 μm en longueur et entre 5 et 10 μm en largeur. Le noyau du fibroblaste est légèrement allongé dans l'axe de la cellule tandis que le cytoplasme est caractérisé par son abondance en réticulum endoplasmique rugueux, un appareil de Golgi volumineux et des ribosomes libres [15-17].

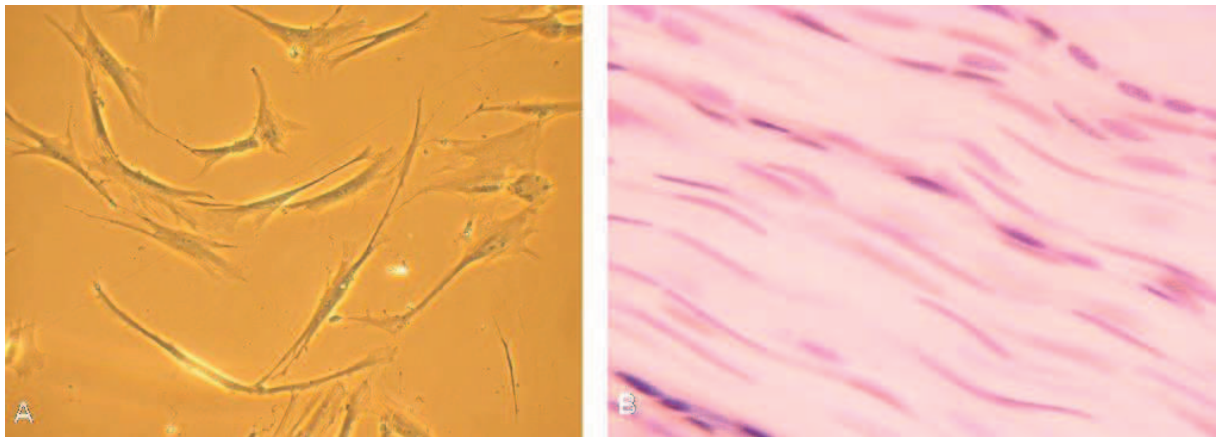


Figure I-1: Fibroblastes observés en microscopie optique en culture (A) et en coupe histologique de tendon (B)(extrait de odec.ca et de bioidiac.bio.uottawa.ca)

Les fibroblastes sont présents en quantité relativement faible au sein des ligaments et tendons. Ils sont localisés en rangées allongées et séparées les unes des autres par la MEC et en particulier par les fibres de collagène auxquelles ils sont liés (**Figure I-2**). Ils forment ainsi un réseau cellulaire qui joue un rôle important non seulement dans la communication intercellulaire mais aussi dans les propriétés mécaniques du tissu en renforçant partiellement le réseau macromoléculaire de la MEC [8, 18]. Les fibroblastes jouent par ailleurs un rôle important dans le renouvellement de la MEC (et en particulier des collagènes) en sécrétant certaines enzymes, les protéinases, qui dégradent les collagènes à remplacer et participent à l'homéostasie du tissu.

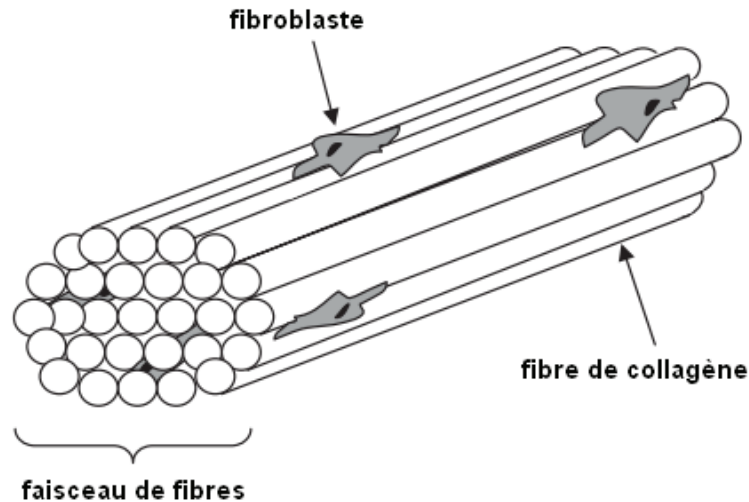


Figure I-2 : Interaction fibroblastes - faisceaux de fibres de collagène [15]

Dans une bien moindre mesure que les fibroblastes, des chondrocytes sont également présents dans ces tissus au niveau des insertions osseuses du ligament ou du tendon dans des zones définies comme du cartilage fibreux (ou fibrocartilage). Il s'agit d'un tissu non vascularisé intermédiaire entre le tissu conjonctif fibreux et le cartilage, un autre tissu conjonctif spécialisé et riche en fibres de collagènes de type II, IX et XI. Les chondrocytes ont généralement une morphologie arrondie ou ovale et ont un diamètre compris entre 10 et 40 μm (**Figure I-3**) [16].

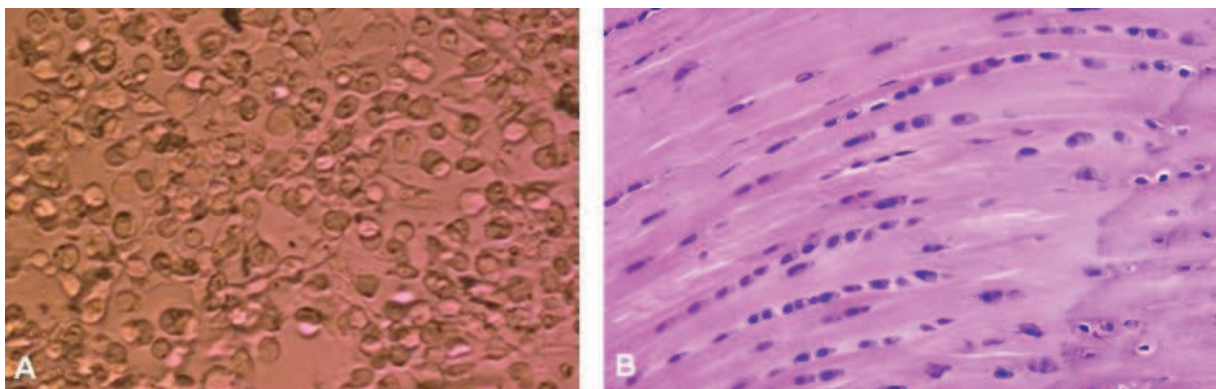


Figure I-3 : Chondrocytes observés en microscopie optique en culture (A) et en coupe histologique de fibrocartilage (B) (extrait de bcru.ulg.ac.be et de studyblue.com)

1.1.2. Matrice extracellulaire

La MEC peut se diviser en deux parties distinctes : la partie fibreuse et la substance fondamentale amorphe. Cette substance fondamentale fortement hydratée et semblable à un gel comble l'espace existant entre les fibres, stabilise l'ensemble de la structure et apporte une résistance en compression au tissu. Elle est essentiellement constituée de GAG et protéoglycanes (acide hyaluronique, fibromoduline, décorine, lumican, etc) et de glycoprotéines (fibronectine, ténascine-C, laminine, etc). On peut souligner le rôle de la fibronectine, protéine adhésive qui favorise l'attachement des fibroblastes à la MEC, ou encore de la ténascine-C, protéine anti-adhésive qui limite l'attachement des cellules à la fibronectine. Par ailleurs, certaines de ces protéines peuvent également être présentes dans l'ensemble de la MEC sous forme soluble [19].

Etant majoritairement constituée de fibres de collagènes et de fibres élastiques, la fonction de la partie fibreuse est essentiellement mécanique. Vingt-huit types de collagène numérotés de I à XXVIII sont actuellement recensés [20]. Les collagènes de type I, III et, dans une moindre mesure, de type V sont les plus abondants au sein des ligaments et tendons. Le type I étant plutôt résistant et le type III plutôt élastique, leurs abondances relatives respectives ont une forte influence sur les propriétés mécaniques finales des tissus. Faisant partie de la catégorie des collagènes fibrillaires, ces trois types de collagène sont issus de l'assemblage spontané (mais stabilisé par l'action de la l'xyloxydase) d'une unité structurale, la molécule de tropocollagène, elle-même issue du procollagène. Le procollagène est composé de trois chaînes α -polypeptidiques de structure périodique Gly-X-Y (où Gly est la glycine et X et Y sont majoritairement la proline et l'hydroxyproline) enroulées les unes autour des autres pour former une triple hélice (280 nm de long et 1,5 nm de diamètre) d'environ 1000 acides aminés. Après sécrétion dans la MEC par exocytose, cette triple hélice terminée par deux propeptides amino- et carboxy terminaux non hélicoïdaux subit une scission de ses extrémités grâce à l'action de procollagène peptidases, des amino et carboxy protéinases, conduisant ainsi à la formation du tropocollagène (*Figure I-4*).

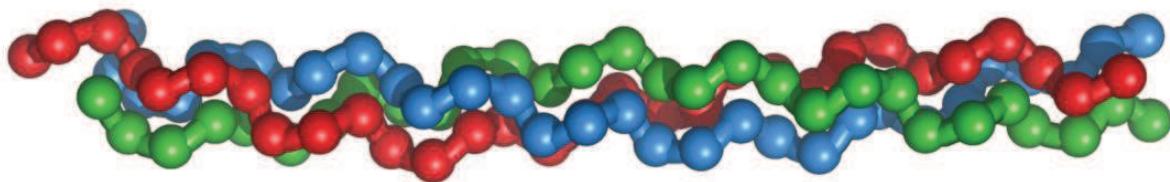


Figure I-4 : Structure en triple hélice du tropocollagène (extrait de www.ebi.ac.uk)

Les collagènes ainsi formés ont la capacité, par auto-réticulation de la lysine, de s'assembler en fibrilles à striation périodique (plusieurs microns de long et 50 nm de diamètre) qui, bien qu'elles puissent être issues de collagène de types différents, peuvent à leur tour s'assembler en fibres mixtes appelées fibres hétérotypiques [21].

Il est important de noter que d'autres types de collagènes non fibrillaires (notamment IX, X, XI, XII et XIV) peuvent également s'intégrer à ces fibres hétérotypiques ou encore former des assemblages non fibrillaires dans la MEC. Enfin, ces fibres hétérotypiques se regroupent pour former des faisceaux de fibres primaires puis secondaires voire tertiaires (chacun entouré d'une membrane appelée endotendon), eux-mêmes regroupés pour former le tissu ligamentaire ou tendineux (entouré d'une autre membrane appelée périendon) (**Figure I-5**).

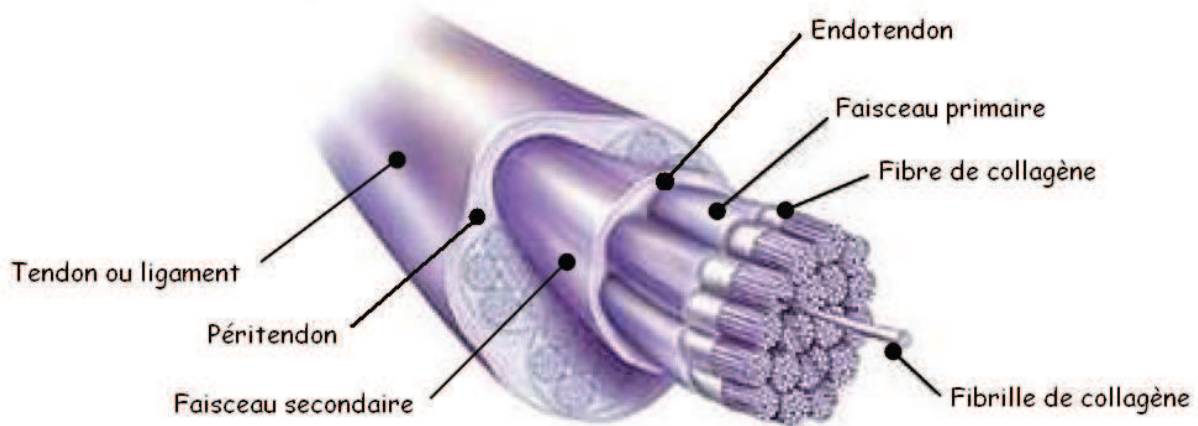


Figure I-5 : Structure des ligaments et tendons (extrait de sportscooprsetbienetre.webnode.fr)

Si les fibres de collagènes confèrent en grande partie leur résistance mécanique aux ligaments et aux tendons, leur caractère élastique trouve plusieurs origines [22]. Il provient tout d'abord de l'agencement de ces fibres de collagène. Intrinsèquement peu extensibles, leur disposition en rangées parallèles légèrement ondulées d'une part (**Figure I-1B**, **Figure I-6A et B**) et en fibres obliques pouvant engendrer des enchevêtrements d'autre part (**Figure I-6C**) permet en effet une certaine extensibilité de la structure.

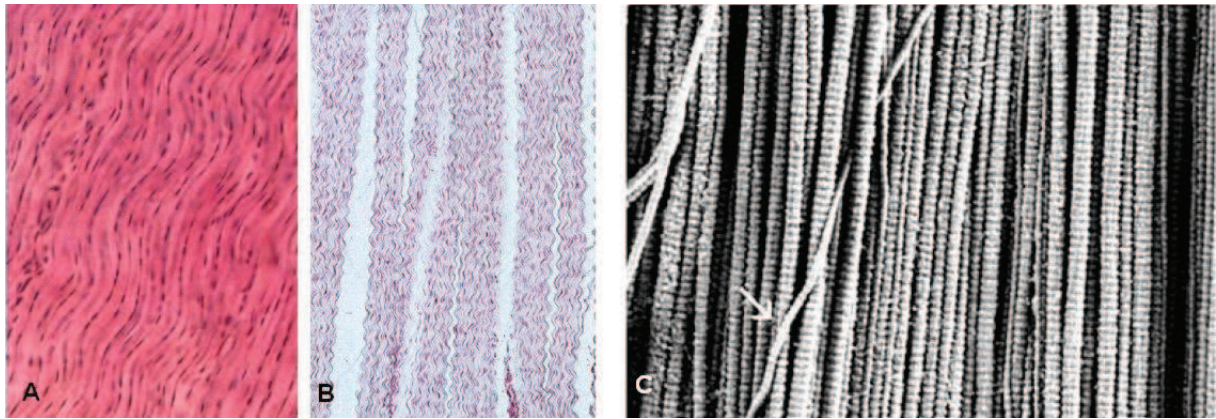


Figure I-6 : Coupes histologiques de tendon (A) et de ligament (B) (extrait de www.db-gersite.com) et fibres de collagène observées au MEB (C) [22]

La seconde origine de l'élasticité des tissus réside dans les fibres élastiques composées d'élastine et de fibrilline, deux protéines synthétisées par les fibroblastes et assemblées à l'extérieur des cellules, à proximité de la membrane plasmique. La fibrilline est organisée en microfibrilles alignées et noyées dans une matrice de molécules d'élastine réticulées entre elles de manière covalente (**Figure I-7**). Le tout constitue une structure semblable à un matériau composite dont la matrice serait l'élastine et les renforts les microfibrilles de fibrilline. Cette architecture particulière ainsi que la réticulation de l'élastine, capable de se dérouler de façon réversible sous étirement, confèrent son élasticité à la fibre élastique ainsi formée.

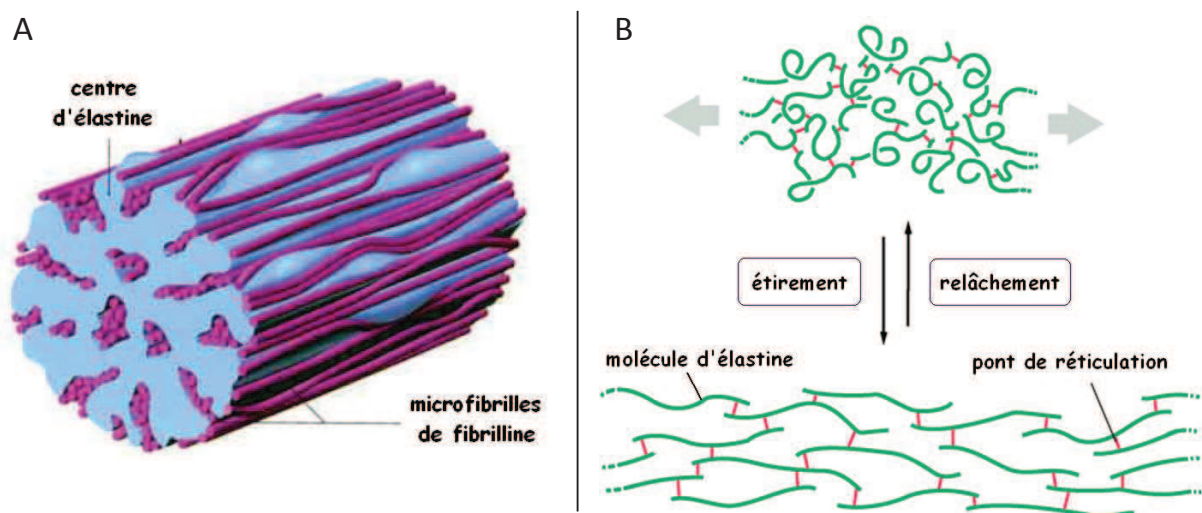


Figure I-7 : Structures d'une fibre élastique (A) [23] et de l'élastine (B) [19]

1.2. Anatomie et propriétés

Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé d'orienter nos travaux vers le remplacement des ligaments et plus particulièrement du ligament croisé antérieur (LCA) du genou. Ce choix a notamment été fait parce qu'il est l'un des tissus les plus fréquemment endommagés parmi les ligaments et tendons et présente donc un intérêt particulier d'un point de vue clinique et industriel. A ce jour, il est d'ailleurs l'un des plus étudiés par les différents laboratoires de recherche. Dans la suite de ce rapport et sauf indication contraire, il sera donc question du LCA.

1.2.1. Anatomie du genou

Les tendons assurent les liaisons os-muscle tandis que les ligaments sont responsables des liaisons os-os. Dans le cas du genou (*Figure I-8*), les liaisons du fémur, os de la cuisse, avec le tibia et le péroné (ou fibula), os de la jambe, sont principalement assurées par les ligaments croisés (antérieur et postérieur) et collatéraux (tibial et fibulaire), le tendon rotulien (liaison rotule-tibia) et le tendon du quadriceps fémoral (liaison rotule-quadriceps).

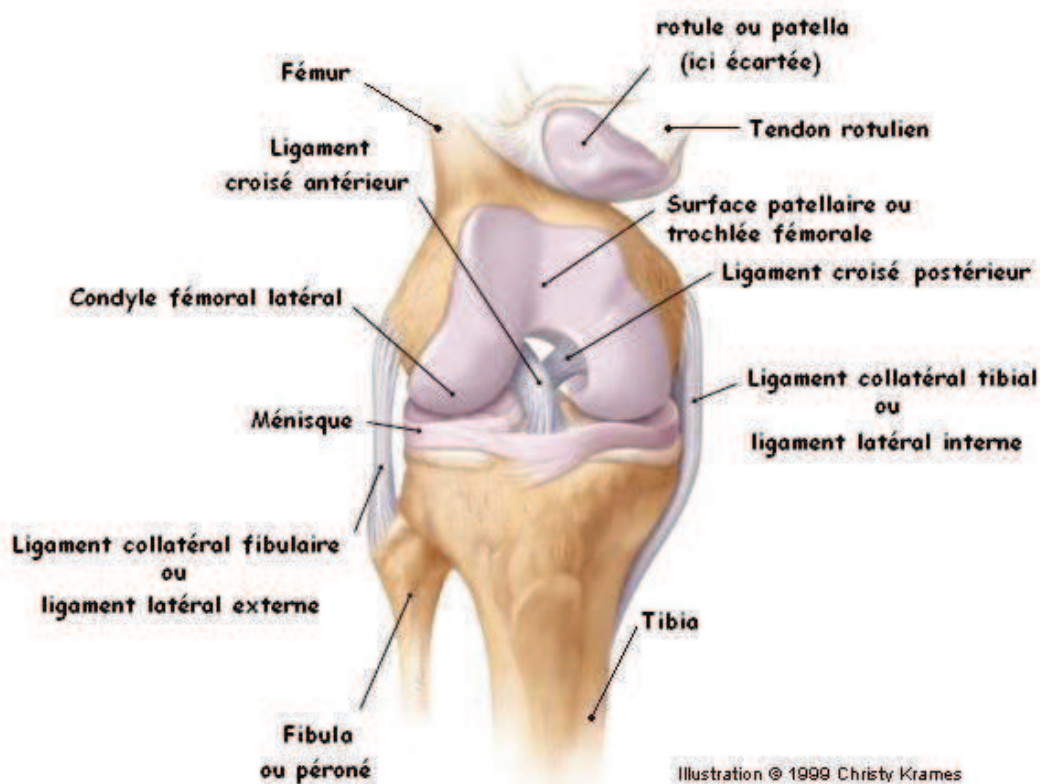


Figure I-8: Planche anatomique du genou (jambe droite) [24]

Alors que les tendons assurent la transmission des forces exercées par les muscles et permettent ainsi les mouvements, les ligaments ont pour fonction de transmettre ces mouvements et efforts mécaniques entre le fémur et le tibia. Ils garantissent également la stabilité de l'articulation en limitant sa mobilité et en prévenant les mouvements extrêmes afin de préserver son intégrité anatomique. Chaque tendon et ligament possède un rôle bien particulier dans l'articulation du genou. Le LCA s'oppose notamment à la translation antérieure et à la rotation interne du tibia par rapport au fémur. Le genou possède également une capacité de rotation axiale (tibia par rapport au fémur) de près de 55° [25] qui s'accompagne d'un enroulement des deux ligaments croisés (rotation interne) ainsi qu'une capacité de flexion-extension correspondant à une rotation limitée à environ 140° dans le plan sagittal et associée à une amplitude de torsion des faisceaux de fibres périphériques du LCA d'environ 90° [8].

1.2.2. Anatomie du LCA

Comme leur nom l'indique, les ligaments croisés se croisent au centre du genou alors qu'ils relient le fémur au tibia, on les qualifie donc de ligaments intra-articulaires. Entourés d'une membrane synoviale et de liquide synovial, ils constituent à eux deux le pivot central de l'articulation. Le LCA [7], situé à l'avant du ligament croisé postérieur (LCP), est attaché au condyle fémoral latéral et descend en direction du plateau tibial vers l'avant et l'intérieur de l'articulation (***Figure I-8, Figure I-9***).

Pouvant mesurer de 26 à 38 mm de long environ pour un diamètre compris entre 7 et 12 mm [25-27], le LCA ne fonctionne en fait pas comme une simple bande fibreuse mais se divise en deux parties : le faisceau antéromédial (AM) et le postérolatéral (PL) (***Figure I-9***). Cette hypothèse, bien qu'adoptée par le plus grand nombre, reste encore sujette à controverse au sein de la communauté scientifique ; certains affirmant qu'il n'y a pas de preuve d'une division en faisceaux et d'autres ayant opté pour un découpage en trois faisceaux (AM, PL et intermédiaire). Cependant, il est généralement admis que le LCA possède deux bandes de fonctionnalités différentes : l'extension du genou serait associée à un resserrage du faisceau PL et à une laxité relative du faisceau AM et inversement lors de la flexion [26].

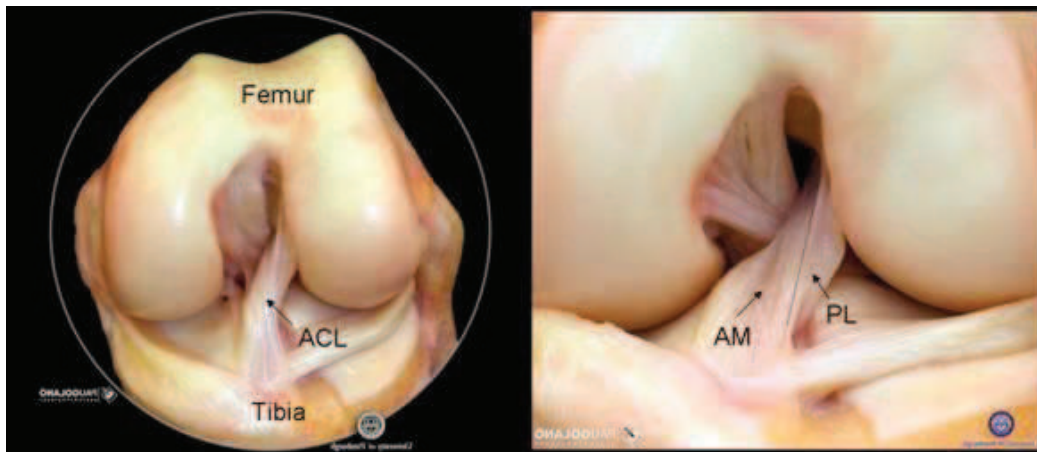


Figure I-9 : Anatomie du genou (jambe gauche) avec mise en évidence des faisceaux du LCA (noté ici ACL) (extrait de ortho.medicine.pitt.edu)

On distingue par ailleurs trois zones de microstructure dans le LCA : la zone proximale (proche de l'insertion fémorale) fortement cellularisée en chondrocytes, la zone intermédiaire moins cellularisée (fibroblastes) mais riche en fibres de collagènes de type I et III, et la zone distale (proche de l'insertion tibiale) dont la structure est proche de celle de la zone proximale. L'approvisionnement en sang des ligaments croisés se fait principalement par l'intermédiaire de l'artère géniculée médiane (AGM) issue de l'artère poplitée et par conséquent de l'artère fémorale [28, 29]. Malgré cela, seule la zone proximale du LCA est largement irriguée, la zone distale l'est beaucoup moins et la zone intermédiaire, riche en fibres de collagène est, quant à elle, presque avascularisée. Cette faible vascularisation est d'ailleurs à l'origine de la très faible capacité de cicatrisation du LCA qui, contrairement à certains tendons par exemple, ne pourra pas guérir spontanément suite à un endommagement. En revanche, les ligaments et tendons et notamment le LCA sont dotés d'un niveau élevé d'innervation, ce qui leur confère un rôle sensitif reconnu [30].

1.2.3. Propriétés mécaniques du LCA

Les propriétés mécaniques des ligaments et tendons et en particulier du LCA ont été très largement étudiées et modélisées depuis de nombreuses années [31, 32]. Malgré tout, ces propriétés sont particulièrement difficiles à établir et restent encore aujourd'hui relativement mal connues. La caractérisation mécanique se heurte en effet à de nombreux problèmes tels que la morphologie irrégulière du LCA, sa cinématique fortement dépendante du mouvement, les conditions physiologiques associées (hydratation, température) et la variabilité des

propriétés en fonction des individus (sexe, âge, état de santé, condition physique) et des méthodes de conservation des tissus avant leur étude. Un certain nombre de comportements caractéristiques est cependant connu et accepté par la majorité de la communauté scientifique.

Le comportement mécanique du LCA le plus couramment évalué est sans nul doute son comportement mécanique en traction uniaxiale dans l'axe de travail du ligament. Lors de ce genre d'essai effectué à vitesse de déformation constante et en général relativement faible (on parle alors d'essai statique), la courbe déformation-contrainte présente un profil bien spécifique (*Figure I-10*).

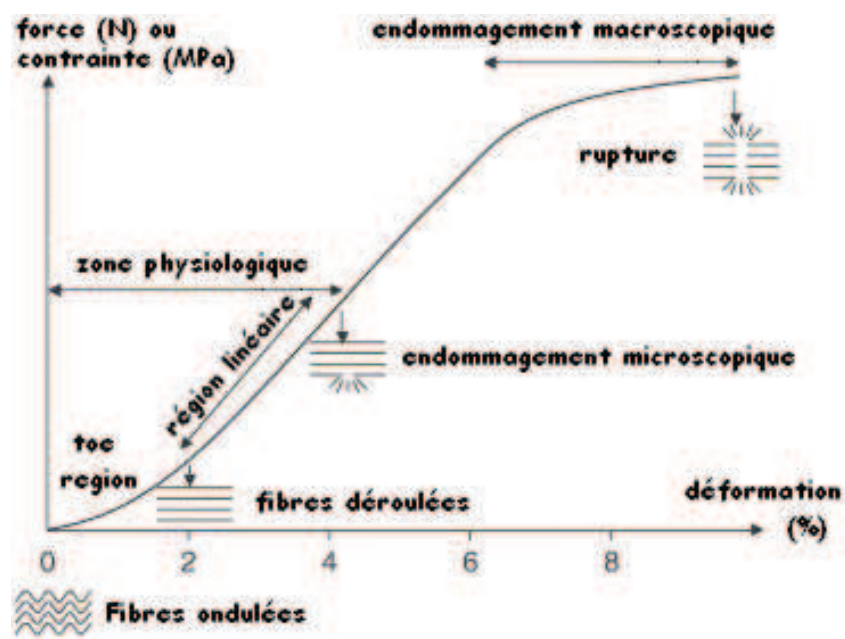


Figure I-10 : Courbe déformation-contrainte des ligaments et tendons [33]

Le ligament présente tout d'abord une zone physiologique de faible raideur correspondant au recrutement et au déroulement progressifs des fibres de collagène et appelée "pied de la courbe" (*toe region*). Certains auteurs [34] estiment que cette zone est divisible en deux sous-parties, une première courte et linéaire (*toe region*) et une seconde (*heel region*) qui constituerait une zone de transition entre la *toe region* et la région suivante. Celle-ci, la région linéaire, est caractérisée par une augmentation de la raideur due au fait que les fibres de collagènes sont entièrement déroulées. Elle correspond à l'étirement des fibres constituant le tissu et à la raideur propre aux collagènes. Cette zone linéaire, dans laquelle le tissu suit la loi de comportement de Hooke ($\sigma = E \cdot \epsilon$), est d'ailleurs celle qui est utilisée pour déterminer le module d'Young E du ligament. Enfin, la courbe présente une dernière région de plus faible

raideur (éventuellement suivie d'une diminution de la contrainte), la zone d'endommagement, où les fibres de collagène rompent les unes après les autres jusqu'à conduire à la rupture totale du ligament. La zone physiologique, c'est-à-dire la zone dans laquelle le LCA travaille dans des conditions physiologiques normales, se limite théoriquement au pied et à la zone linéaire de cette courbe de traction.

Les nombreux travaux basés sur de tels tests de traction ont ainsi permis de déterminer différentes caractéristiques mécaniques du LCA (**Tableau I-2**). Ces valeurs sont évidemment très fortement dépendantes des conditions du test [27], en particulier de la vitesse de déformation choisie. La contrainte subie par un ligament aura en effet tendance à augmenter avec cette vitesse, ce qui traduit la nature viscoélastique de ce tissu. On estime par exemple que la plupart des ruptures du LCA surviennent dans un domaine de vitesses de déformation comprises entre 50 et 150 % /s [35].

Propriétés	Valeurs
Raideur (N/mm)	111 - 397
Module d'Young (MPa)	49 - 163
Pied de la courbe (%)	1,5 - 4,8
Début d'endommagement (%)	7 - 16
Déformation à la rupture (%)	19 - 36
Force à la rupture (N)	739 - 2300
Contrainte à la rupture (MPa)	13,7 - 36,4

Tableau I-2 : Propriétés mécaniques en traction uniaxiale du LCA humain [36]

Dans le domaine de l'étude biomécanique des ligaments, un article datant de 1984 [37] fait encore aujourd'hui office de référence. Ses auteurs y présentent une valeur de force à la rupture de 1725 N qui est citée dans la plupart des articles traitant du LCA. A titre de comparaison, on estime qu'un LCA supporte chaque année entre 1 et 2 millions de cycles de 300 N et subit régulièrement des forces allant de 67 N (montée d'escaliers) ou de 445 N (descente d'une rampe) à 630 N (jogging) [8, 27, 36].

L'étude du LCA en traction uniaxiale seule ne suffit pas à décrire complètement son comportement mécanique, c'est pourquoi de nombreuses investigations ont été menées afin de mettre en évidence, caractériser, simuler et modéliser son caractère viscoélastique [38-44]. En particulier, des essais de relaxation, de fluage ou de sollicitations cycliques ont été mis à profit afin d'établir des modèles de comportement de plus en plus complexes et ont notamment permis de démontrer l'importance des notions d'éducation, de vieillissement, et de mémoire évanescence des tissus en tant que matériaux dans l'étude des ligaments et des tendons.

1.3. Pathologies et traitements

1.3.1. Généralités

Les tendons et ligaments peuvent être touchés par diverses pathologies de gravités très variables. On considère aujourd'hui qu'il y a une augmentation globale du nombre de traumatismes de ces tissus qui serait notamment liée à une pratique sportive croissante d'une partie de la population d'une part et, à l'amélioration des conditions de cette pratique du sport (matériel de meilleure qualité qui permet une diminution du nombre de fractures mais provoque un transfert des traumatismes vers les tendons et ligaments) d'autre part. Parmi les lésions les plus fréquentes de ces tissus, on trouve notamment les tendinites et les entorses.

Les tendinites (terme parfois employé par abus de langage pour désigner toute tendinopathie) sont des pathologies touchant les tendons et faisant intervenir un mécanisme inflammatoire. On peut les classer en trois catégories selon leur origine :

- les tendinites mécaniques dues à des contraintes répétées et excessives exercées sur le tendon, il s'agit par exemple des tendinites de traction (souvent associées à la pratique sportive ou à des tâches répétitives), tendinites par frottement (associées à une inflammation de la gaine synoviale) ou des tendinites par choc ;
- les tendinites d'origine infectieuse, par exemple suite à une migration bactérienne chez une personne victime d'une carie ou d'un abcès des gencives ;
- les tendinites dues à une consommation médicamenteuse (essentiellement des antibiotiques de la famille des fluoroquinolones) ou à certaines habitudes alimentaires (hydratation insuffisante, taux élevé d'acide urique, abus de sucre...).

Les entorses (ou foulures) sont, quant à elles, des blessures traumatiques des ligaments qui surviennent lors d'une sollicitation forcée et excessive d'une articulation. Selon sa gravité, la blessure consiste en une élongation temporaire ou permanente du ligament (éventuellement accompagnée d'un arrachement osseux) voire en une déchirure partielle ou totale de celui-ci.

Si le tissu possède une capacité de cicatrisation suffisante, ce qui est par exemple le cas du ligament collatéral tibial (*Figure I-8*), un processus de guérison spontanée pourra survenir après lésion [9, 45]. Ce processus est découpé en trois phases successives : l'inflammation du tissu endommagé (intervention des cellules du système immunitaire), la phase de réparation (prolifération des fibroblastes et production de MEC, en particulier de collagène de type III) et enfin la phase de remodelage (maturation de la MEC et des tissus, alignement des fibres de collagène) (*Figure I-11*).

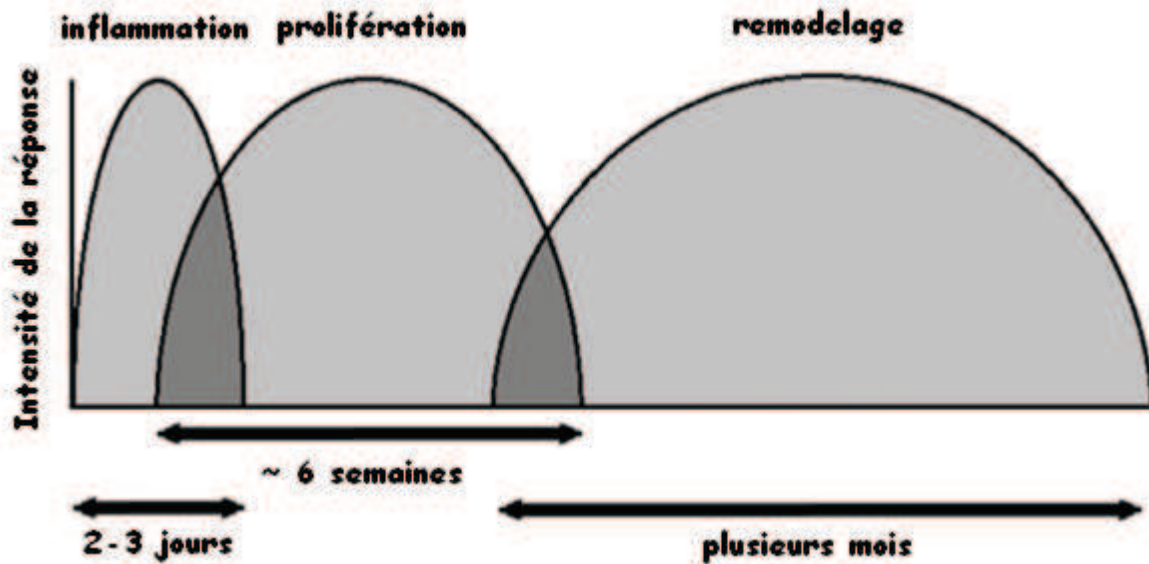


Figure I-11 : Les trois phases de la cicatrisation des ligaments et tendons (adapté de [45, 46])

En fonction de la localisation et de la gravité de la blessure, la cicatrisation des tissus lésés et la récupération des patients peuvent être favorisés par différents traitements : immobilisation de l'articulation ou au contraire exercices physiques, cryothérapie, application d'anti-inflammatoire ou encore thérapies aux ultrasons ou au laser [45, 46].

1.3.2. Rupture et réparation du LCA

Comme expliqué précédemment, les cas les plus graves de blessure d'un ligament conduisent à une rupture partielle voire totale de celui-ci. Dans le cas du LCA, ligament auquel nous avons choisi de nous consacrer, quatre mécanismes de rupture sont actuellement recensés (**Figure I-12**) :

- hypertorsion (varus rotation interne ou valgus rotation externe) du tibia par rapport au fémur vers l'intérieur ou l'extérieur, blessure souvent liée à la pratique d'un sport de pivot (changement brutal de direction) ou de ski et éventuellement associée à une blessure d'un ligament collatéral ;
- hyperextension suite à la contraction du quadriceps, blessure typique du *shoot* dans le vide au football ;
- hyperflexion, par exemple suite à une retombée sur la jambe fléchie ou à une violente contraction du quadriceps pour se relever chez le skieur ;
- choc latéral sur l'articulation, en particulier de l'extérieur vers l'intérieur.

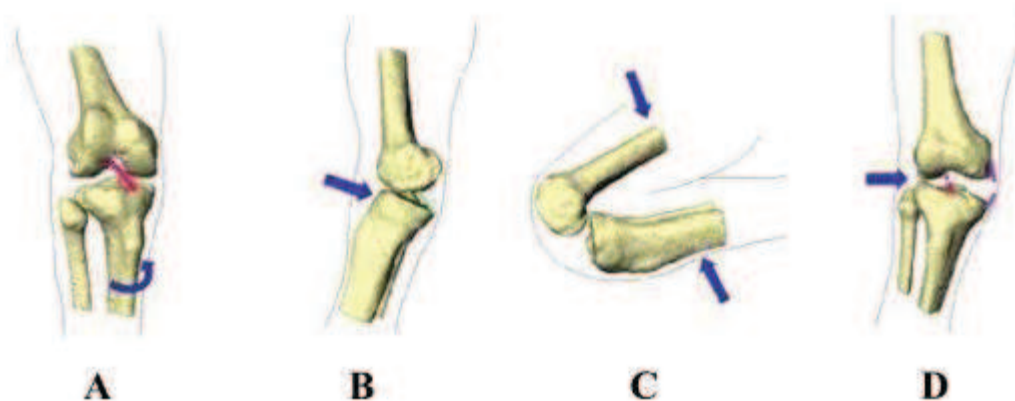


Figure I-12 : Modes de rupture du LCA [39]:hypertorsion (A), hyperextension (B), hyperflexion (C), choc latéral (D)

Dans le cas d'une rupture d'un ligament tel que le LCA qui est constitué de zones peu ou pas vascularisées, le tissu n'a pas la capacité de cicatriser, la blessure ne peut donc pas guérir spontanément. C'est pourquoi aujourd'hui, lorsqu'un médecin juge la reconstruction du LCA nécessaire chez un patient, il lui faut intervenir chirurgicalement. Au fil des années et des progrès de la médecine, plusieurs stratégies chirurgicales ont été développées et pratiquées.

Si les premières tentatives de réparation du LCA ont consisté en de simples sutures du ligament lésé, les techniques opératoires ont rapidement été orientées vers l'utilisation de greffes biologiques [2]. Les xéno greffes et allo greffes (respectivement greffes d'origine animale et d'origine humaine) ne sont aujourd'hui presque plus utilisées en raison des risques d'infection, de réaction immunitaire et de transmission de maladie qu'elles impliquent. Malgré les bons résultats obtenus avec les allo greffes [2, 47], celles-ci présentent une difficulté supplémentaire liée au manque de donneurs et sont essentiellement pratiquées en seconde intention chez des patients ayant déjà subi au moins une greffe autologue.

Les greffes autologues (ou autogreffes) constituent justement le *gold standard* actuel. Elles sont aujourd'hui de loin les plus pratiquées pour la réparation du LCA. Elles consistent à prélever chez le patient blessé, un tendon ou une portion de tendon dans une autre localisation anatomique et de l'utiliser comme greffon pour remplacer le LCA rompu. Ce greffon est mis en place au travers de tunnels osseux préalablement percés dans le fémur et le tibia et fixé à l'aide de vis d'interférence (le plus souvent dégradables) et éventuellement d'autres systèmes, agrafe ou endo-bouton par exemple. Le tiers moyen du tendon rotulien (TR), les tendons de la patte d'oie (ou tendons du droit-interne et du demi-tendineux, DIDT) et plus rarement la *fascia lata* (portion épaisse de l'aponévrose entourant les muscles de la cuisse) sont les tissus les plus couramment employés dans ce sens. Ces techniques opératoires qui donnent d'excellents résultats et portent les noms de Kenneth - Jones (éventuellement Mac Intosh au TR), DIDT et Mac Intosh au *fascia lata* permettent évidemment de s'affranchir des contraintes des autres procédures citées précédemment et présentent l'avantage d'être peu invasives puisque l'implantation du greffon se fait par voie arthroscopique. Néanmoins, elles peuvent induire une morbidité du site donneur et engendrer des douleurs résiduelles sur ces mêmes sites, en particulier lors de l'utilisation du TR. Il faut également savoir que même après les 6 à 12 mois nécessaires à la cicatrisation et à la rééducation, le greffon ne remplacera jamais parfaitement le LCA, notamment en raison d'une diminution de ses propriétés mécaniques juste après l'implantation (cette baisse est atténuée par la suite grâce à la rééducation du patient) et d'une absence de régénération nerveuse (pas de restauration de la proprioception).

Au cours des années 1970-80, on a également pu assister à un fort développement des prothèses synthétiques définitives (**Tableau I-3**) principalement à base de fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE), de poly(téréphtalate d'éthylène) (PET), de polypropylène (PP) ou encore de fibres de carbone [48]. Ayant pour objectif de pouvoir pratiquer des

remplacements du LCA permettant une remobilisation immédiate de l'articulation, par exemple dans le cas des sportifs de haut niveau souhaitant un retour rapide à la compétition, la communauté scientifique orthopédique (chercheurs et médecins) a mis au point des prothèses dotées des propriétés mécaniques suffisantes dès l'implantation [47]. A l'époque, rapidement plébiscités par les chirurgiens, ces ligaments artificiels ont tout d'abord permis d'obtenir de très bons résultats mais n'ont malheureusement pas fait l'objet d'études à long terme suffisamment rigoureuses et approfondies [1]. Quelques années après implantation, de très nombreux cas de ruptures souvent accompagnées de complications (synovites) sont en effet survenus. La plupart de ces prothèses ont été confrontées à des problèmes d'érosion provoquant la libération dans la cavité synoviale de particules du ligament artificiel, de fatigue du matériau à long terme, de mauvaise intégration tissulaire, d'infection, etc. Leur utilisation a finalement été quasiment abandonnée. Quelques prothèses implantées comme tuteur de régénération (*Ligament Augmentation Device* LAD) sont encore employées et différentes études sont menées (notamment sur le LARS) dans le but d'améliorer la biocompatibilité et la biointégration du matériau afin de provoquer une recolonisation cellulaire et une régénération tissulaire après implantation [49].

Prothèse	Matériau	Structure textile	Force de rupture (N)	Raideur (N / mm)
Dacron Stryker	PET	tissé	3045	420
Leeds-Keio	PET	tissé	2000	180
Gore-Tex	PTFE	tressé	5300	322
Proflex	PET	tressé	4500	280
LARS	PET	tricoté	2500 - 5000	x
LCA humain	x	x	739 - 2300	111 - 397

Tableau I-3 : Propriétés du LCA humain et de ligaments artificiels [1, 47, 48]

2. Biomatériaux et ingénierie tissulaire

Malgré toutes les stratégies de réparation du LCA développées au cours des années et présentées précédemment, de nombreux progrès sont encore possibles : les allogreffes sont difficiles à trouver et comportent de nombreux risques ; les greffes synthétiques constituent un échec aux yeux de la plupart des chirurgiens orthopédistes et ne sont pratiquement plus

employées ; les autogreffes peuvent générer des douleurs et ne peuvent pas être renouvelées indéfiniment en cas de rupture après une première ligamentoplastie. La volonté de réussir à mettre au point la solution idéale à cette problématique ainsi que la naissance et l'essor de nouvelles disciplines, l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative, ont donné un nouvel élan à la recherche sur la reconstruction ligamentaire.

2.1. Concepts et définitions

2.1.1. L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est un terme qui est apparu officiellement en 1988 [50] et qui désigne un domaine interdisciplinaire réunissant l'ingénierie et les sciences de la vie dans le but de développer des substituts biologiques permettant de rétablir, maintenir ou améliorer une fonction tissulaire [5, 6, 51]. Ce domaine repose généralement sur l'association de trois éléments : les cellules, la matrice et la stimulation. Les cellules sont prélevées sur un être vivant, isolées et cultivées *in vitro*, puis sontensemencées sur une matrice (ou *scaffold*) qui aura un rôle de support et de guide de régénération des tissus. Cette matrice, constituée de biomatériaux dans une architecture spécifique, peut éventuellement être biorésorbable afin de laisser place, à mesure qu'elle se dégrade, aux néotissus formés. Enfin, les stimulations (en particulier chimiques, biochimiques et mécaniques au sein d'un bioréacteur) appliquées à la matrice et aux cellules permettent d'induire certaines réactions, par exemple une différenciation ou une spécialisation des cellules afin que celles-ci adoptent un phénotype particulier ou encore une éducation mécanique du matériau constituant la matrice [52]. La matriceensemencée ou les tissus régénérés qui en résultent peuvent finalement être implantés chez le patient (**Figure I-13**).

L'ingénierie tissulaire présente de nombreux avantages. Elle contourne par exemple les problèmes de manque de donneurs d'organes et de rejet immunitaire puisque ce sont idéalement les cellules mêmes du patient qui sont utilisées pour la régénération tissulaire. L'utilisation de matériaux biorésorbables destinés à être éliminés de l'organisme évite le problème du devenir du matériel : contrairement aux prothèses ligamentaires évoquées précédemment, il n'est pas nécessaire que ces matériaux conservent leurs propriétés mécaniques tout au long de la vie du patient et ils ne risquent pas de causer de pathologies liées à l'érosion et à la libération de particules dans le corps à long terme.

L'ingénierie tissulaire n'est pas pour autant une stratégie que l'on peut mettre en place sans difficultés. Les cellules utilisées sont parfois particulièrement délicates à prélever ou à cultiver *in vitro*, leur prélèvement peut impliquer une intervention chirurgicale qui n'est pas anodine. Les stimulations à mettre en œuvre pour obtenir la réponse cellulaire souhaitée peuvent être très difficiles à déterminer. Enfin, la conception de la matrice de régénération est soumise à un cahier des charges parfois très lourd : biocompatibilité, biorésorbabilité, cinétique de dégradation adaptée, propriétés mécaniques proches de celles des tissus natifs... Réparer ou régénérer des tissus grâce à l'ingénierie tissulaire demande une connaissance de domaines très différents (sciences des matériaux, biologie cellulaire, médecine) et l'ajustement de très nombreux paramètres.

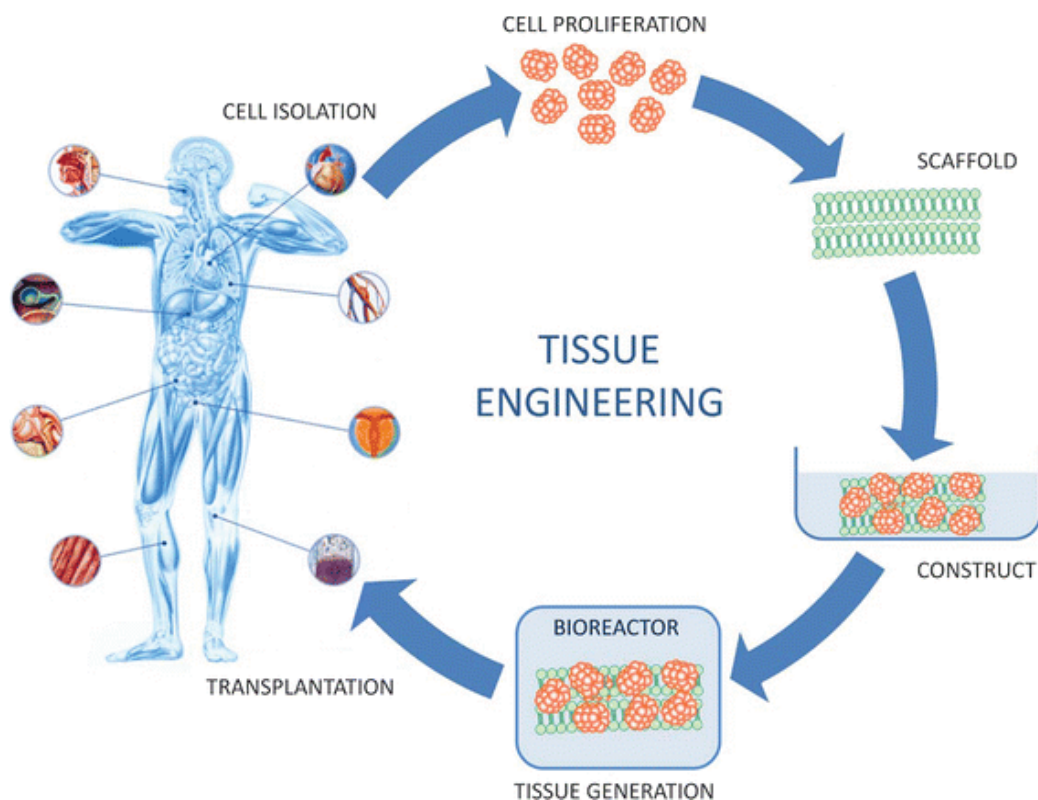


Figure I-13 : Principe général de l'ingénierie tissulaire [53]

2.1.2. Les biomatériaux

Le développement de l'ingénierie tissulaire repose donc notamment sur les matériaux utilisés. La notion de biomatériau a été officiellement définie puis mise à jours lors des conférences de Chester de la Société Européenne des Biomateriaux (*European Society for Biomaterials*) en 1986 et 1991. Cette définition est aujourd'hui généralement admise par la communauté scientifique : un biomatériau est "un matériau non vivant utilisé dans un

dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle". Cette définition n'est cependant pas figée et reste sujette à discussions et modifications comme en témoigne celle proposée par Williams en 2009 : "un biomatériau est une substance qui a été conçue pour prendre une forme qui, seule ou dans le cadre d'un système complexe, est utilisée pour diriger, par le contrôle des interactions avec des éléments de systèmes vivants, le déroulement de toute procédure thérapeutique ou diagnostique, dans la médecine humaine ou vétérinaire"[54].

L'utilisation de plus en plus intensive de biomatériaux a naturellement mené à la définition d'un certain nombre de nouvelles notions, à commencer par celle de biocompatibilité. La biocompatibilité caractérise la tolérance du milieu biologique receveur vis-à-vis du biomatériau, c'est-à-dire la capacité de l'hôte à l'accueillir sans effet néfaste. Il s'agit non seulement des effets du biomatériau sur l'organisme (définition essentiellement négative : le matériau ne doit pas être cytotoxique, immunogène, mutagène, carcinogène, tératogène, thrombogène, etc.) mais aussi des effets de l'organisme sur le biomatériau (le matériau ne doit pas être dégradé ou altéré au détriment de ses propriétés et de la fonction qu'il doit assurer ou en générant des résidus toxiques). La biocompatibilité a également été définie au cours des conférences de Chester comme "*la capacité d'un matériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique*". On comprend alors que la notion est plus complexe qu'elle n'y paraît au premier abord et en engendre une nouvelle : la bioactivité du biomatériau.

Contrairement à la biocompatibilité qui pourrait sous-entendre une simple inertie du biomatériau dans son environnement, la bioactivité implique une interaction entre eux : le matériau peut interagir avec les cellules et tissus de l'hôte (par exemple limiter voire empêcher l'adhésion cellulaire dans le cas d'un treillis de correction des hernies [55]) ou induire des réactions biologiques particulières (un fil de suture résorbable induit notamment une réaction inflammatoire qui participe à la résorption du matériau). La biofonctionnalité désigne quant à elle la capacité du biomatériau à remplir la fonction pour laquelle il a été conçu pendant toute sa durée d'utilisation. Elle est liée à ses différentes caractéristiques intrinsèques ou découle de sa mise en forme : propriétés physico-chimiques, mécaniques et thermiques, dégradabilité et stabilité (vis-à-vis des procédés de stérilisation, de la corrosion, de l'hydrolyse...), morphologie, validité, efficacité, conformité, etc.

2.2. Catégories et applications des biomatériaux

L'homme tente depuis des millénaires d'utiliser les matériaux dont il dispose pour guérir ses blessures. On sait aujourd'hui que dans la Chine ancienne et chez les Aztèques, l'or était utilisé en dentisterie. Des prothèses de mains, pieds et orteils faites de bois et de cuir datant de l'Egypte ancienne ont également été retrouvées (**Figure I-14**), ainsi que des traces de réparation dentaire avec de la nacre ou de remplacement de l'œil avec de la pierre dans des vestiges mayas du Honduras [56].

Les différents biomatériaux employés peuvent être classés en quatre catégories selon leur nature : les matériaux métalliques (métaux et alliages), les céramiques, les matériaux d'origine naturelle et les polymères synthétiques.



Figure I-14 : Prothèse d'orteil découverte en Egypte près de Louxor [57]

2.2.1. Biomatériaux métalliques

Les métaux et alliages métalliques figurent parmi les premiers à avoir été utilisés comme biomatériaux dans des implants. Exception faite du titane qui est doté d'une très bonne biocompatibilité et est largement employé dans les prothèses orthopédiques, les biomatériaux métalliques se trouvent rarement à l'état pur mais plutôt sous forme d'alliages. Les différents alliages à base d'acier ont également été très présents en orthopédie, par exemple dans les vis et plaques d'ostéosynthèse non résorbables. Enfin, l'un des alliages à application biomédicale les plus populaires ces dernières années est le nitinol, alliage de nickel et de titane qui a la particularité d'être un matériau à mémoire de forme en plus d'être résistant à la corrosion et d'être visible en radiologie et par IRM. Ces propriétés en font un matériau de choix pour la fabrication d'accessoires orthodontiques et de prothèses vasculaires

(stents). L'emploi des biomatériaux métalliques reste malgré tout limité par les risques de corrosion qui peut survenir à long terme et des réactions immunitaires qui en résultent.

2.2.2. *Biomatériaux céramiques*

Les céramiques, matériaux essentiellement inorganiques et non métalliques caractérisés par des températures de fusion élevées, une inertie chimique (résistance à la corrosion) et un comportement mécanique rigide et fragile, sont également présentes dans de nombreuses applications biomédicales. L'alumine et la zircone (oxydes d'aluminium et de zirconium) sont par exemple des céramiques bioinertes (non résorbables) résistantes à l'usure qui sont utilisées dans les têtes des prothèses de hanche où elles ont un rôle principalement mécanique. D'autres céramiques comme l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique β sont au contraire biorésorbables. Constituants naturels de l'os, ils ont des propriétés ostéoconductrices (leur contact favorise la repousse osseuse) et présentent un intérêt tout particulier en tant que substituts osseux ou ciments de comblements dentaires et osseux. Néanmoins, leurs mécanismes de dégradation sont mal connus et leur synthèse (en particulier pour l'obtention de structures poreuses) est mal maîtrisée, ce qui constitue encore aujourd'hui un frein à leur utilisation.

2.2.3. *Biomatériaux d'origine naturelle*

Les matériaux d'origine naturelle (dont de très nombreux polysaccharides et dérivés) ont tout naturellement attiré l'attention des chercheurs en quête de matériaux biocompatibles. Parmi ceux-ci on trouve notamment :

- le collagène, constituant naturel de la MEC, est très présent dans les applications biomédicales (cosmétologie, chirurgie esthétique, systèmes de libération de médicament, ingénierie tissulaire, etc.) en particulier en raison de ses propriétés hémostatiques et mécaniques [58, 59] ;
- la cellulose (polymère naturel le plus abondant sur terre) et ses dérivés sont des polysaccharides largement employés dans des applications biomédicales y compris dans la conception de matrices d'ingénierie tissulaire [60] ;
- la chitine et son dérivé le chitosane (obtenu par désacétylation), polysaccharides aminés principalement extraits d'exosquelettes de crustacés (la chitine est le

deuxième polymère naturel le plus abondant) sont appréciés pour leurs propriétés antibactériennes et utilisés dans des applications de chirurgie reconstructrice (peau artificielle) [61] ;

- les fucanes et carraghénanes, polysaccharides extraits d'algues très répandus dans les hydrogels [62, 63] ;
- le corail, de composition assez proche de celle de l'os, est utilisé pour la reconstruction ou le remplacement osseux [64].

Ces matériaux présentent néanmoins quelques inconvénients tels que des risques importants d'infections et de réactions immunitaires.

2.2.4. Biomatériaux polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont très certainement la classe de biomatériaux la plus vaste et la plus répandue. Leur très grande variété offre de nombreuses possibilités en ce qui concerne leurs propriétés (chimiques, thermiques, mécaniques, dégradabilité, etc.) et par conséquent leurs applications. Nous distinguerons ici les polymères biostables (non résorbables) destinés aux implantations permanentes ou nécessitant une explantation, des polymères biorésorbables destinés aux applications temporaires.

Les polymères biostables (**Tableau I-4**) appartiennent à différentes familles et possèdent chacun des propriétés caractéristiques qui les rendent adaptés à des applications spécifiques. Le PE qui est chimiquement inerte et peut être synthétisé avec des masses molaires très variées (*low density PE, high density PE, ultra high density PE*) est utilisé dans des prothèses orthopédiques ou sous forme textile pour des fils de suture. Le PMMA, transparent et mécaniquement résistant, est également employé en orthopédie mais aussi dans des implants oculaires. Le PTFE est doté d'une importante inertie chimique et de propriétés antiadhésives qui en font un polymère apprécié pour la fabrication de prothèses textiles vasculaires ou de correction des hernies. La consistance des silicones peut être modulée par le choix de la nature des substituants R liés au silicium, le PDMS est par exemple utilisé comme gel dans les prothèses mammaires.

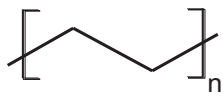
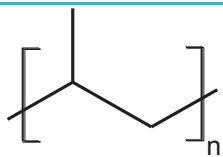
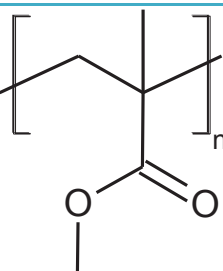
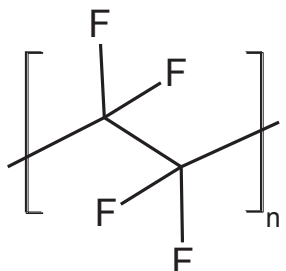
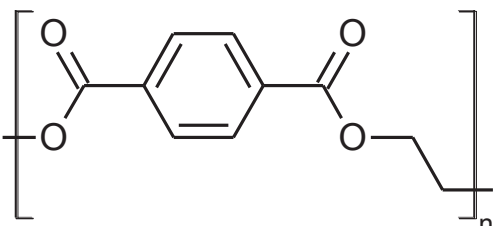
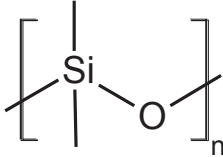
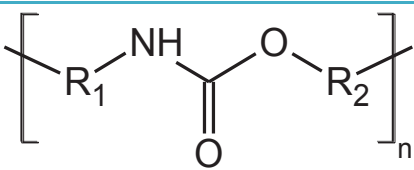
	Polymère	Structure
Polyoléfines	Polyéthylène PE	
	Polypropylène PP	
Résines acryliques	Poly(méthacrylate de méthyle) PMMA	
Fluoropolymères	Polytétrafluoroéthylène PTFE	
Polyesters	Poly(téréphtalate d'éthylène) PET	
Silicones	Polydiméthylsiloxane PDMS	
Polyuréthanes	(formule générale) PU	

Tableau I-4 : Exemples de biomatériaux polymères biostables

Famille	Polymère	Structure
Poly(α -hydroxyacides)	Polyglycolide PGA	
	Poly lactide PLA	
Poly(β -hydroxyacides)	Poly(3-hydroxybutyrate) PHB	
	Poly(3-hydroxyvalérate) PHV	
	Poly(β -acide malique)	
Poly(γ -hydroxyacides)	Polyvalérolactone PVL	
Poly(ϵ -hydroxyacides)	Poly(ϵ -caprolactone) PCL	
	Poly(ϵ -décalactone) PDL	
Autres	Poly(1,4-dioxane-2,3-dione)	
	Poly(<i>para</i> -dioxanone) PDS	

Tableau I-5 : Principaux polyesters aliphatiques

Les polymères synthétiques biorésorbables sont au contraire des polymères ayant la capacité à se dégrader et dont on sait que les produits de dégradation peuvent être éliminés par l'organisme (par métabolisation ou par filtration rénale). Depuis les années 1960, leur utilisation dans le domaine de la santé s'est largement popularisée puisqu'ils permettent la conception de prothèses à usage temporaire et notamment de supports de régénération pour l'ingénierie tissulaire [65]. Parmi eux, la classe la plus notable est celle des polyesters aliphatiques (*Tableau I-5*), polymères hydrophobes formés de motifs liés entre eux par une liaison ester et comprenant à la fois des polymères produits par voie bactérienne comme les poly(β -hydroxyacides) et des polymères obtenus par ouverture d'hétérocycles ou par polycondensation d'hydroxyacides ou de diacides et de diols [66-68]. Trois d'entre eux, le PLA, le PGA et la PCL, sont particulièrement utilisés dans les applications biomédicales en raison de leur biocompatibilité (ils sont approuvés par la FDA) et de la variété de propriétés qu'ils permettent d'obtenir en fonction de leur structure chimique, de leur masse molaire et de leur cristallinité.

2.3. PLA et PCL : synthèse et propriétés

Comme expliqué précédemment, le PLA et la PCL figurent parmi les polyesters les plus répandus pour les applications médicales parmi les polyesters aliphatiques. Dans cette section sont décrites leurs méthodes de synthèse, et leurs propriétés.

2.3.1. Synthèse

Ces polymères peuvent être obtenus par deux voies de synthèse différentes : la polycondensation et la polymérisation par ouverture de cycle (POC) [68]. La polycondensation ne permet cependant d'obtenir que des masses molaires relativement faibles. De ce fait, il est généralement nécessaire de compléter ce type de polymérisation par des réactions de couplage afin d'obtenir des polymères dotés de propriétés mécaniques raisonnables [69]. Pour obtenir des masses molaires élevées, une POC du lactide pour le PLA (*Figure I-15*) et de l' ϵ -caprolactone pour la PCL (*Figure I-16*) lui est donc préférée.

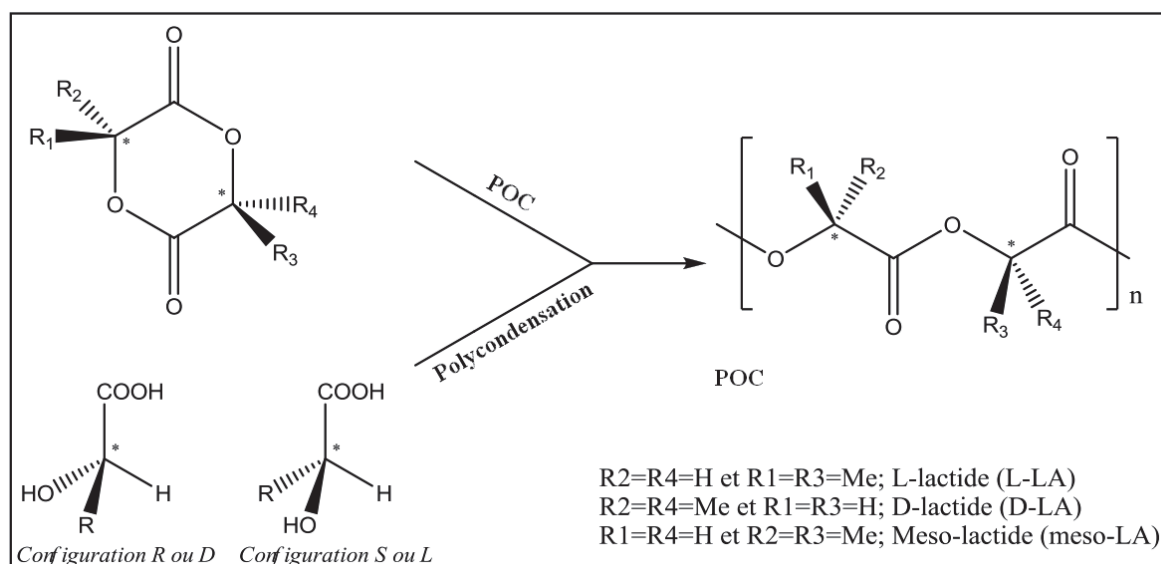


Figure I-15 : Synthèses et structures du PLA

Dans le cas du PLA, il est intéressant de noter la possibilité de faire varier la stéréochimie du polymère grâce à la stéréochimie des monomères utilisés comme le L-lactide (L-LA) et le D-lactide (D-LA). Le PLA résultant pourra être constitué uniquement de motifs L-LA, D-LA ou des deux, on pourra alors parler respectivement de poly(L-lactide) PLLA, de poly(D-lactide) PDLA ou de poly(D,L-lactide) (PDLLA). Il existe une nomenclature quant à l'appellation de ces différents stéréocopolymères [70] : un PLA sera désigné PLA_x où x représente le pourcentage d'unités L-LA le constituant.

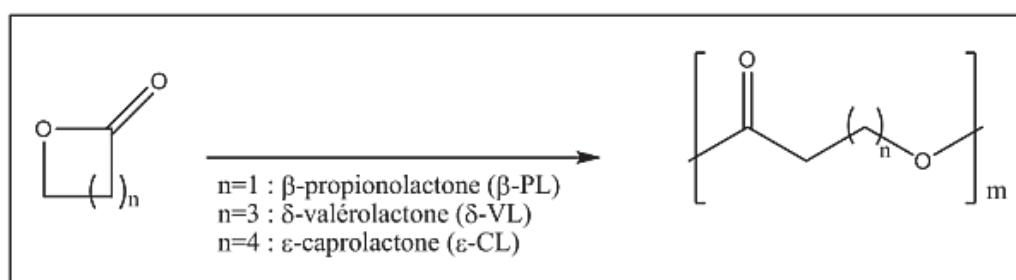


Figure I-16 : Polymérisation par ouverture de cycle de lactones

Pour les deux polymères, la POC peut être amorcée par trois types de mécanismes : cationique, anionique et coordination/insertion. Dans la pratique, les synthèses par voie cationique et par voie anionique sont confrontées à de nombreuses réactions secondaires de transestérifications inter- et intra-moléculaires et le mécanisme coordination/insertion (POCI)

est majoritaire. Celui-ci s'opère par amorçage à l'aide de composés protiques (essentiellement des alcools) et de dérivés organométalliques comme catalyseurs tels que, dans le cadre des réglementations strictes appliquées dans le domaine médical, l'octanoate d'étain (2-éthyl hexanoate d'étain) ou le lactate de zinc, tous deux approuvés par la FDA. L'octanoate d'étain est actuellement le catalyseur le plus employé, notamment en raison de son efficacité. Ce type de polymérisation est le plus souvent réalisé en masse, sous vide et à des températures comprises entre 110 et 150 °C. Les mécanismes de la polymérisation POCI ont été largement étudiés, ce qui n'empêche pas certains points mécanistiques de faire encore aujourd'hui l'objet de débats [71-73].

2.3.2. Propriétés

Les propriétés du PLA et de la PCL (*Tableau I-6*), en particulier thermiques, mécaniques et de dégradation, sont fortement liées à différents paramètres.

Dans le cas du PLA, ces propriétés sont essentiellement dépendantes de la cristallinité du polymère et par conséquent de sa masse molaire et de sa stéréochimie. Le PLA est en effet un polymère dont la cristallinité varie très fortement en fonction de sa teneur en motifs stéréoisomères : le PLA₁₀₀ est par exemple semi-cristallin avec une température de fusion (T_f) d'environ 170°C tandis qu'à partir d'environ 12 % de motifs D-LA, on estime que le PLA est totalement amorphe [74]. L'augmentation de la cristallinité du PLA en fonction de sa composition énantiomérique va se traduire mécaniquement par une augmentation du module d'Young, de la limite d'élasticité et de la contrainte de rupture (E , σ_y , et σ_r) mais aussi par une diminution des déformations élastique et de rupture (ε_y et ε_r). L'augmentation de la cristallinité s'accompagne par ailleurs d'une augmentation de l'hydrophobie du polymère ce qui aura des conséquences sur sa cinétique de dégradation comme cela sera évoqué plus tard.

Le deuxième facteur influant fortement sur les propriétés de ces polymères est la masse molaire. Plus celle-ci est élevée et moins les chaînes macromoléculaires seront mobiles et moins elles auront la capacité à former des structures cristallines stables : l'augmentation de la masse molaire se traduira donc par une diminution de la cristallinité. Pourtant, elle aura sur les propriétés mécaniques des conséquences similaires à celles d'une cristallisation importante, c'est-à-dire une augmentation de E , σ_y , et σ_r et une diminution de ε_y et ε_r [75-77].

Dans le cas de la PCL (*Tableau I-6*), malgré l'absence de carbone asymétrique, la cristallinité est un facteur ayant une forte influence sur les propriétés du polymère mais c'est avant tout la masse molaire qui régit ces propriétés. La PCL est également un polymère semi-cristallin dont la cristallinité diminue tandis que sa masse molaire augmente (taux de cristallinité de 80 % avec une masse molaire 5 000 g/mol et de 45 % pour 60 000 g/mol) [76]. La PCL est globalement plus souple que le PLA et peut donc s'avérer plus intéressante pour des applications nécessitant une certaine élasticité. La PCL est par ailleurs plus hydrophobe et plus cristalline que le PLA, ce qui lui confère une dégradation plus lente.

Polymères		Propriétés mécaniques			Propriétés thermiques	
		E (MPa)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)	Tg (°C)	Tf (°C)
PLA	PLA ₁₀₀	3 600	58	2,1	54 à 65	159 à 181
	PLA _{87,5}	3 400	46	1,6	50 à 60	x
	PLA ₇₅	3 300	46	3,2		x
	PLA _{62,5}	2 800	41	2,9		x
	PLA ₅₀	3 200	48	8,7		x
PCL 44 000 g/mol	400	16	80	-62 à -60		57 à 64
PCL 200 000 g/mol	549	20	576			

Tableau I-6 : Propriétés thermiques et mécaniques du PLA et de la PCL [74-76, 78-80]

2.3.3. Dégradation

La dégradation est une notion importante dans le cadre de l'utilisation de polymères comme le PLA et la PCL. Cette dégradation est essentiellement hydrolytique mais aussi, dans une bien moindre mesure, enzymatique [81]. La dégradation hydrolytique s'effectue par hydrolyse des liaisons esters. Pour le PLA et la PCL, elle conduit à la formation respective d'acide lactique et d'acide 6-hydroxyhexanoïque qui ont l'avantage d'être des métabolites, c'est-à-dire des produits naturellement présents dans l'organisme, ce qui assure leur excellente biocompatibilité.

La dégradation hydrolytique [82-84] de ces polymères se fait selon un processus bien précis : les molécules d'eau pénètrent tout d'abord dans le matériau entraînant un gonflement dû à la prise d'eau et déclenchent la dégradation chimique qui s'accompagne d'une diminution de la masse molaire. Surviennent ensuite une diminution des propriétés mécaniques et finalement une perte de masse par diffusion des oligomères hors de la matrice polymère (*Figure I-17*).

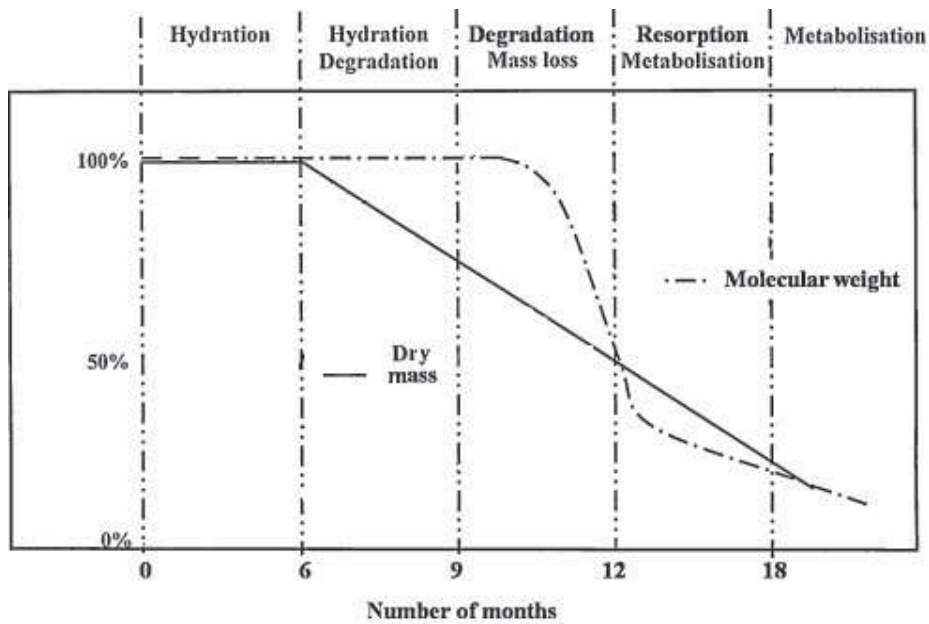


Figure I-17 : Evolution des propriétés d'un polymère au cours de la dégradation hydrolytique [85]

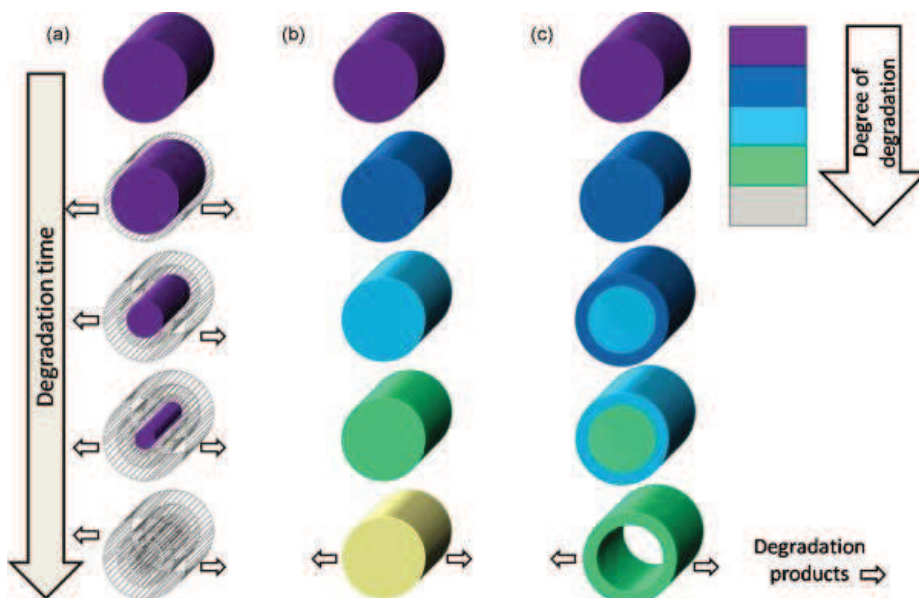


Figure I-18 : Modes de dégradation des polymères dégradables : érosion en surface (a), dégradation en masse (b), et dégradation en masse avec autocatalyse (c) [85]

Cette dégradation peut s'opérer soit en surface (de manière hétérogène) soit en masse (de manière homogène) (**Figure I-18**). Dans le cas du PLA, l'érosion est en théorie essentiellement homogène, les scissions de chaînes au cœur du matériau et l'apparition de groupements carboxyle ont néanmoins tendance à provoquer une autocatalyse acide du phénomène de dégradation et par conséquent à accélérer le processus au sein du matériau par rapport à la surface [85-88].

En conclusion, le développement et l'utilisation des biomatériaux ont connu un essor important ces dernières décennies. Un intérêt particulier a été porté au PLA et à la PCL, polyesters aliphatiques dégradables particulièrement prisés pour leur biocompatibilité et pour le large éventail de propriétés qu'ils permettent d'obtenir. La nécessité de développer des supports de régénération dégradables fait d'eux des matériaux de choix pour l'ingénierie tissulaire qui est une discipline en pleine expansion. Les progrès dans ce domaine et l'existence de tels matériaux dégradables ont conduit de nombreux chercheurs à se pencher sur des solutions alternatives aux techniques chirurgicales actuelles pour la réparation et surtout la régénération des ligaments en général et du LCA en particulier. Les deux prochaines parties de cette étude bibliographique sont consacrées à ces recherches, aux matrices de régénération d'une part et aux aspects cellulaires et tissulaires d'autre part.

3. L'ingénierie tissulaire du ligament

La conception d'une matrice de régénération tissulaire repose sur deux aspects essentiels : le ou les matériaux qui la constituent et la mise en forme que l'on choisit de leur conférer. Le rôle de la matrice obtenue est double : elle doit non seulement permettre et guider la colonisation cellulaire et la reconstitution des tissus mais aussi assurer la fonction du tissu à remplacer (en particulier mécanique) le temps que celui-ci se reforme et puisse l'assurer lui-même. Idéalement, il faudrait également que la régénération tissulaire et la dégradation de la matrice se produisent avec des cinétiques similaires afin que le tissu prenne progressivement le relais du matériau. Ce résultat est évidemment très difficile à obtenir voire utopique dans la mesure où la dégradation est généralement mal maîtrisée et la formation des tissus dépend fortement des caractéristiques de la matrice. Néanmoins, il est nécessaire de mettre au point un support de régénération qui, tout en étant pourvu des caractéristiques inhérentes aux biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire (biocompatibilité, biorésorbabilité), sera doté de propriétés mécaniques proches de celles du ligament (cf. § I.1.2.3) [89-94].

Lorsque l'on dispose de la bonne matrice de régénération, le deuxième facteur à maîtriser est l'aspect cellulaire. L'objectif final étant la recolonisation cellulaire et la régénération des tissus, il est nécessaire d'apporter à ce support de reconstruction la source cellulaire qui permettra d'obtenir un nouveau ligament. Il est également important que ce néoligament soit fonctionnel, ce qui ne sera possible que si les cellulesensemencées possèdent les phénotypes adaptés. Le choix du type cellulaire et des conditions de culture sera donc crucial pour la reformation des tissus.

Dans cette partie sont tout d'abord évoqués les deux aspects matériaux et mise en forme (architecture) dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du ligament puis les deux aspects concernant la biologie cellulaire, c'est-à-dire les types de cellules utilisés pour la régénération du ligament et les éventuelles conditions de culture et types de stimulation associés.

3.1. Les matériaux des matrices de régénération

Les matériaux employés pour la conception de matrices de régénération ligamentaire s'inscrivent dans trois catégories : les matériaux biologiques, les polymères d'origine naturelle et les polymères synthétiques biorésorbables.

3.1.1. Matériaux biologiques

Les matériaux biologiques décellularisés composés de MEC provenant de mammifères peuvent apparaître comme le choix le plus naturel comme supports de régénération du ligament [95]. Leur composition et leur structure (en particulier collagénique) proches de celles du tissu ligamentaire offrent en effet une structure naturellement adaptée. Les supports biologiques les plus répandus dans le cadre de la régénération du ligament proviennent du **derme**, du **péricarde** et surtout de la **sous-muqueuse de l'intestin grêle (SIS)**. Ils sont le plus souvent d'origine humaine, bovine, porcine ou équine. L'utilisation de tels supports repose sur l'application de certains traitements à ces tissus qui constituent en fait des greffes allogéniques ou xénogéniques : la décellularisation, la réticulation et la stérilisation [96]. Le but du processus est de nettoyer le tissu de tous ses constituants non collagéniques, en particulier les cellules et toutes traces d'ADN, afin d'éviter les réactions immunitaires tout en préservant la structure de collagène.

Les matrices tirées de péricardes restent encore rares pour ce type d'applications. Les matrices de derme ont jusqu'à maintenant été principalement utilisées pour la réparation des tendons de la coiffe des rotateurs (ensemble musculo-tendineux situé au niveau de l'articulation de l'épaule) [97] ou du tendon d'Achille [96], grâce notamment aux matrices commercialisées sous les noms de Graftjacket[®], Zimmer[®] ou BioBlanket[®]. Dans cette application, le Graftjacket semble présenter les meilleures propriétés mécaniques et n'a pas provoqué de réaction inflammatoire chez les patients opérés. Certaines études mettent cependant en évidence un nombre non négligeable de déchirures récurrentes suite à l'opération [98, 99]. Le Zimmer et le Bioblanket semblent quant à eux induire douleurs, déchirures et réactions inflammatoires [96] et nécessitent des études plus approfondies.

Les matrices de SIS, en particulier les prothèses d'origine porcine commercialisées Restore[®], sont également utilisées pour le traitement des tendons de la coiffe des rotateurs avec des résultats intéressants mais certaines études ont révélé des réactions inflammatoires chez les patients greffés [97, 100]. De plus, des essais *in vivo* ont été menés sur la réparation de certains ligaments du genou au moyen de ce type de matrice. L'utilisation de SIS pour la réparation du ligament collatéral tibial chez le lapin [101, 102] a permis d'obtenir une amélioration morphologique, mécanique et moléculaire par rapport aux sujets simplement suturés. Dans les deux cas, les propriétés mécaniques restent cependant largement inférieures à celles du ligament natif (modules d'Young respectifs de 387 et 291 MPa contre 1142 MPa pour le tissu natif). Enfin, des matrices de SIS canine implantées sur des lapins en association avec un traitement de plasma enrichi en plaquettes pour remplacer des LCA rompus [103] ont montré une bonne intégration osseuse dans les tunnels d'insertion mais une importante diminution des propriétés mécaniques 8 semaines après implantation. Une étude comparative menée entre des autogreffes de tendon rotulien et des matrices de SIS porcine pour la réparation de LCA de chèvre [104] a mis en évidence une réponse inflammatoire provisoire au cours des premiers mois après implantation ainsi que des évolutions des propriétés mécaniques très différentes : la force de rupture des autogreffes a augmenté de 253 à 879 N après 12 mois tandis que celle des matrices de SIS a diminué de 721 à 293 N après 3 mois pour ensuite augmenter jusqu'à 706 N au bout de 12 mois.

La stratégie consistant à employer des tissus biologiques comme matrice de régénération ligamentaire constitue une solution intéressante pour les chirurgiens puisque nombre de produits aujourd'hui commercialisés permettent de faciliter l'opération en comparaison avec une autogreffe qui nécessite une intervention en deux étapes (prélèvement

du greffon et implantation). Les propriétés mécaniques de ces tissus restent cependant majoritairement inférieures à celles des ligaments et tendons voire insuffisantes pour les remplacer [96]. De plus, ces matériaux biologiques sont actuellement l'objet d'une controverse dans la mesure où l'efficacité de leur décellularisation est parfois mise en doute [105], la présence d'ADN résiduel pouvant être responsable de réactions inflammatoires observées chez certains patients.

3.1.2. Polymères d'origine naturelle

Les polymères d'origine naturelle apparaissent également comme un choix immédiat dans la quête de matériaux mimant la structure naturelle d'un ligament et ses propriétés. Parmi eux, la soie et le collagène ont connu un succès tout particulier.

Le **collagène** est un choix évident puisqu'il est le composant naturel majoritaire du ligament après l'eau et le support des fibroblastes. Il présente par conséquent des propriétés mécaniques et de biocompatibilité tout à fait intéressantes pour une application ligamentaire. Pouvant être extrait et purifié à partir de tissus conjonctifs, des recherches ont été menées dès les années 1990 sur l'utilisation de collagène bovin extrudé dont les fibres étaient agencées parallèlement. La croissance tissulaire n'a pas été aussi favorisée qu'espéré et les implants ne sont pas parvenus à regagner des propriétés mécaniques suffisantes [106, 107], probablement en raison d'une dégradation trop rapide. Pour ralentir sa cinétique de dégradation et augmenter sa résistance mécanique, une solution consiste à faire réticuler le collagène, que ce soit par voie chimique, physique ou encore enzymatique [108, 109]. Dans les ligaments natifs, il existe en effet des ponts de réticulation au sein de la structure collagénique qui permettent d'accroître sa résistance en tension. Les trois types de réticulation naturelle les plus présents sont l'hydroxylysinonorleucine (HLNL), la dihydroxylysinonorleucine (DHLNL) et l'histidinohydroxymerodesmosine (HHMD) [14]. Dans la mesure où il est difficile de reproduire ce genre de structure naturelle, les agents de réticulation chimique les plus couramment utilisés sont le glutaraldéhyde, le formaldéhyde, les époxydes, les carbodiimides, les azotures et le diisocyanate d'hexaméthylène [110-113]. Bien qu'ils permettent une nette amélioration des propriétés mécaniques, ces agents de réticulation présentent l'inconvénient principal d'être des composés toxiques. Des améliorations mécaniques notables ont également été obtenues avec un dicatéchol, l'acide dihydroguaiarétique (NDGA) mais la biocompatibilité des structures obtenues n'a pas encore été démontrée [108, 114].

L'utilisation de méthodes physiques de réticulation permet en revanche de s'affranchir de composés toxiques. Ces traitements physiques comme le traitement thermique DHT (*dehydrothermal treatment*) [115, 116] ou l'irradiation UV (éventuellement en présence de glucose [117] ou de colorant comme le vert de méthylène [111]) induisent une réticulation plus restreinte et peuvent par ailleurs provoquer une fragmentation partielle des chaînes de collagène [118], réduisant ainsi le gain en termes de propriétés mécaniques. De manière plus anecdotique, des travaux menés avec des extraits de plante (*Myrica rubra*) ont montré l'existence de mécanismes enzymatiques de réticulation du collagène. Des exemples de résultats obtenus avec différentes techniques de réticulation du collagène sont présentés dans le **Tableau I-7**.

Origine du collagène	Réticulation	E (MPa)	σ_r (MPa)	ε_r (%)
Derme bovin	Glutaraldéhyde	407	66	16
	DHT	170	31	18
Tendon bovin fœtal	NGDA	582	91	10
Tendon d'Achille bovin	Carbodiimide	485	50	non déterminé
Tendon bovin	<i>Myrica rubra</i>	23	28	15

Tableau I-7 : Propriétés mécaniques de fibres de collagène de type I après réticulation [109]

Grâce aux différentes stratégies existantes, plusieurs modèles de régénération du ligament à partir de gel et/ou de fibres de collagène ont été proposés [110, 118, 119]. En dehors de quelques rares travaux conduits sur des structures textiles présentant des propriétés mécaniques intéressantes [113, 114, 120], la majorité des produits développés ne possèdent pas de propriétés mécaniques suffisantes ou nécessitent des études plus approfondies, en particulier après ensemencement de cellules et après dégradation. Malgré l'attrait offert par sa biocompatibilité, les principaux inconvénients du collagène résident donc dans ses propriétés mécaniques inadaptées notamment liées à sa cinétique de dégradation trop rapide et dans son caractère parfois immunogène dû à son origine animale. L'utilisation du collagène se heurte de plus à une grande variabilité de ses propriétés inhérente à son origine naturelle.

La **soie** est l'autre polymère naturel privilégié par la communauté scientifique dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du ligament. La soie est un matériau fibreux d'origine animale. Elle est notamment sécrétée par les araignées et par les chenilles de certains papillons mais est produite de manière industrielle à partir du ver à soie (chenille du bombyx du mûrier) ou du ver à soie Tussah. La structure grossière de la soie, matériau essentiellement protéique, consiste en deux filaments de fibroïne (semi-cristalline) entourés d'une gaine de sérécine (amorphe) [121-123]. La sérécine étant aujourd'hui soupçonnée d'être une protéine à caractère immunogène et à l'origine de réactions allergiques [124], la plupart des applications médicales de la soie nécessitent l'élimination de la gaine de sérécine (aussi appelée grès), grâce à des procédés thermo-chimiques comme le décreusage [125, 126]. La soie peut également être utilisée sous sa forme régénérée, c'est-à-dire après application d'un procédé de dissolution-resolidification afin d'éliminer ses défauts ou son hétérogénéité dus à son origine naturelle [127].

Matériau	E (GPa)	σ_r (MPa)	ε_r (%)
Soie du <i>Bombyx mori</i> (avec sérécine)	5 à 12	500	19
Soie du <i>Bombyx mori</i> (sans sérécine)	15 à 17	610 à 690	4 à 16
Soie d'araignée	11 à 13	875 à 972	17 à 18
Tendon	1,5	150	12

Tableau I-8 : Propriétés mécaniques de la soie [121]

Tout l'intérêt de la soie réside dans ses propriétés mécaniques exceptionnelles (**Tableau I-8**) et dans sa cinétique de dégradation qui l'ont rendue populaire dans la fabrication de fils de suture [8]. On estime en effet que la dégradation protéolytique *in vivo* cause la perte de l'intégrité mécanique des fibres de soie après un an et qu'elles sont complètement dégradées après deux ans [18, 108]. Cependant, dans le cadre de la régénération ligamentaire, les propriétés mécaniques de la soie peuvent paradoxalement constituer un inconvénient. Nous expliquons plus tôt qu'un biomatériau utilisé en ingénierie tissulaire doit être capable d'assurer la fonction du tissu à régénérer. Dans le cas présent, la prothèse doit donc pouvoir supporter les mêmes charges qu'un ligament natif. Il ne suffit malheureusement pas d'avoir des propriétés mécaniques plus élevées que le tissu. En effet, un

module d'Young trop élevé serait synonyme de manque de souplesse de l'articulation. Par ailleurs, s'il faut que la prothèse assure la fonction mécanique du ligament pendant la croissance tissulaire tant que le néotissu n'en est pas capable, il faut aussi que la charge mécanique soit transmise progressivement à celui-ci. Dans le cas contraire, c'est-à-dire dans le cas où la prothèse a des propriétés mécaniques trop élevées, aucune éducation mécanique ne s'opère et il en résulte la formation d'un néotissu trop faible qui se rompra dès les premières sollicitations. Il s'agit d'un phénomène appelé *stress shielding* (transfert, déviation ou encore écrantage des contraintes) déjà bien connu dans le cadre des prothèses osseuses mais également avec le ligament [8, 36, 128].

La principale solution pour moduler les propriétés mécaniques de la soie réside dans sa mise en forme. Les structures à base de soie développées pour l'ingénierie tissulaire du ligament sont particulièrement nombreuses et se présentent en général sous différents agencements textiles qui seront décrits plus en détails dans la section suivante (cf. § I.2.2.2). Il existe actuellement des matrices de régénération obtenues à partir de procédés de tricotage, tressage, torsadage ou de combinaison de plusieurs d'entre eux [129-133]. Deux groupes dirigés par Kaplan (Medford - Etats-Unis) et Goh (Singapour) sont aujourd'hui particulièrement impliqués dans de tels projets avec des approches respectives consistant à développer des cordes de soie par torsadage [18, 134-138] et à associer des structures de soie tricotées avec divers *coating* microporeux (fibroïne ou collagène) [139-143]. Les différents travaux effectués ont montré que les structures de soie possèdent une excellente biocompatibilité et permettent de favoriser la colonisation cellulaire (**Figure I-19**) avec des indices de différenciation fibroblastique lors de l'utilisation de cellules souches. Ils ont également prouvé qu'il était possible de moduler l'élasticité de la matrice (module d'Young, limite d'élasticité) en fonction de la structure textile choisie [122, 123] et de fabriquer des structures pouvant tolérer des sollicitations cycliques répétées.

Malgré cela, l'inadéquation des propriétés mécaniques et le *stress shielding* restent les risques principaux liés à l'utilisation de la soie dans les matrices ligamentaires. La biocompatibilité de la soie, sa production peu coûteuse et à grande échelle et sa cinétique de dégradation permettant la conservation de son intégrité mécanique sur des durées relativement importantes font qu'elle reste tout de même l'un des matériaux les plus prometteurs dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du ligament.

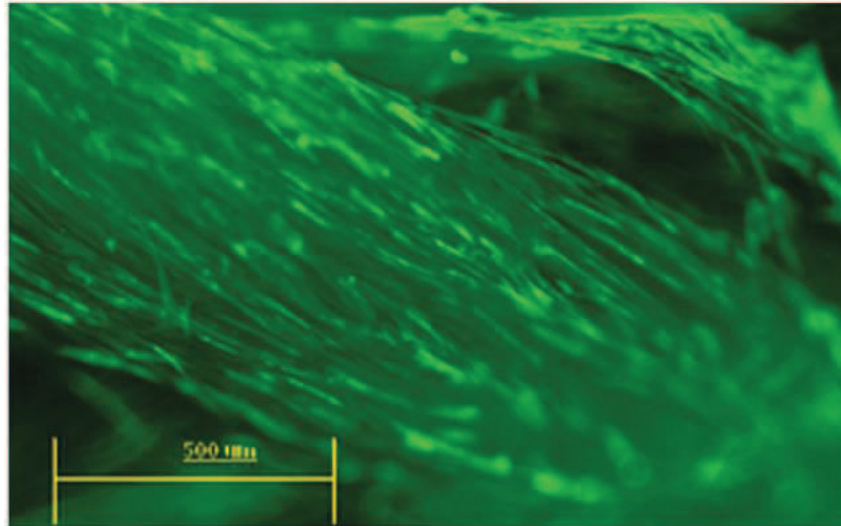


Figure I-19 : Cellules souches sur une matrice en soie tricotée observées en MCF [143]

On peut citer la présence d'autres produits naturels et notamment de **polysaccharides** et de **protéines** dans la composition de certaines matrices ligamentaires. Cette utilisation relativement restreinte est essentiellement destinée à améliorer la biocompatibilité et à favoriser l'adhésion cellulaire sur des matrices d'une nature chimique différente. On trouve par exemple du chitosane incorporé dans des membranes de PCL afin de favoriser la prolifération et l'adoption du phénotype souhaité (expression de collagènes de type I et III) de fibroblastes de LCA [144, 145]. Des matrices fibreuses ont également été développées à partir de tels produits naturels comme la cellulose [146] ou l'acide hyaluronique éventuellement associé au chitosane ou à l'alginate [147-150]. Ces exemples restent relativement rares et si les matrices présentées favorisent effectivement la prolifération cellulaire, elles ne sont généralement pas pourvues de propriétés mécaniques suffisantes [151].

3.1.3. Polymères synthétiques biorésorbables

L'intérêt des polymères synthétiques biorésorbables réside dans la grande liberté de développement qu'ils offrent. Il est en effet possible de moduler leurs propriétés en jouant sur leur composition chimique et leur structure, par exemple en choisissant une masse molaire ou une cristallinité particulières ou en associant deux polymères aux caractéristiques différentes. D'autre part, ces polymères sont pour la plupart peu coûteux, peuvent être produits en grande quantité de manière industrielle et sont des polymères thermoplastiques, ce qui rend leur mise en forme aisée et permet le développement d'une grande variété de structures différentes.

Dans cette catégorie de matériaux, les polymères les plus utilisés dans l'ingénierie tissulaire du ligament sont tout simplement ceux qui sont les plus populaires dans les applications biomédicales temporaires, c'est-à-dire les polyesters aliphatiques comme le PLA, le PGA et la PCL, que ce soit sous forme d'homopolymères ou de copolymères (**Tableau I-5**).

Le **PLA** est le plus répandu des polymères dégradables dans des applications biomédicales et la régénération ligamentaire ne déroge pas à la règle. L'une de ses particularités réside dans sa stéréochimie qui offre la possibilité de faire varier sa cristallinité et par conséquent ses propriétés mécaniques et sa cinétique de dégradation. Le groupe dirigé par Laurencin (Charlottesville – Etats-Unis) a par exemple fourni les principaux travaux avec le PLA [152-155]. Des architectures textiles ont en effet été développées à partir de fibres de PLLA (ou PLA₁₀₀) commerciales et éventuellement de dépôt de fibronectine. Les matrices obtenues ont non seulement montré une très bonne biocompatibilité avec des fibroblastes primaires qui ont proliféré, adopté une morphologie normale, sécrété de la MEC et exprimé certains gènes (collagène, fibronectine) mais étaient aussi dotées de propriétés mécaniques approchant celles du LCA. La matrice privilégiée par les auteurs [153] présentait cependant des valeurs de module d'Young et de contrainte de rupture élevées (82 MPa et 740 MPa respectivement). Il serait intéressant d'étudier l'évolution de ces propriétés au fur et à mesure de la dégradation de la structure et de vérifier que ces valeurs initiales élevées ne risquent pas de causer de phénomène de *stress shielding*. Les résultats des différents travaux de Laurencin *et al.* ont par ailleurs conduit à la création en 2008 de la société *Soft Tissue Regeneration* et une prothèse ligamentaire biorésorbable, le L-C Ligament[®], est actuellement évalué dans le cadre d'essais cliniques chez l'homme.

De nombreuses autres études ont été menées sur des structures en PLA [156-162], la plupart reposant également sur une mise en forme textile à partir de fibres ou de microfibrilles (obtenues par exemple par *electrospinning*). Certaines d'entre elles ont mis en évidence les différences qui résultaient des variations de cristallinité du PLA. Le PLLA est par exemple moins favorable à l'adhésion et à la prolifération cellulaire que le PDLLA, sa cristallinité plus importante lui conférant un caractère hydrophobe plus prononcé comme le montrent les mesures d'angle de contact [156]. En revanche, la présence de blocs cristallins de PLLA au sein d'un copolymère de PLLA et PDLLA et par conséquent de zones plus hydrophobes permet de ralentir la dégradation du matériau et la perte de ses propriétés mécaniques en comparaison avec un PDLLA classique [160].

Les deux autres polymères biorésorbables très courants dans le domaine de la santé que sont la **PCL** et le **PGA** ont également fait l'objet de recherches pour des applications ligamentaires. Comme le PLA, c'est souvent sous une mise en forme textile qu'ils sont employés dans ce domaine. Ils sont en revanche beaucoup moins utilisés que ce dernier sous forme d'homopolymère en raison de leurs propriétés moins adaptables. On estime par exemple le temps de dégradation du PGA entre 6 et 12 mois contre 12 à 24 mois pour le PLA. De plus, si le risque de *stress shielding* peut déjà survenir avec le PLA, le problème est exacerbé avec le PGA qui possède des propriétés mécaniques encore plus élevées, notamment le module d'Young qui peut dépasser 6,9 GPa [163]. Le PGA est donc actuellement très peu exploité dans les applications ligamentaires malgré sa bonne biocompatibilité [152, 156, 164, 165]. La PCL pourrait en revanche être un bon candidat puisqu'elle est moins rigide que le PLA et possède un domaine d'élasticité plus étendu, sa cinétique de dégradation est également plus lente, en partie grâce à sa nature très cristalline [108, 163]. Malgré cela, les exemples restent rares [144, 145, 156, 158, 165, 166].

En revanche, il existe de nombreuses études effectuées sur des **copolymères** de PLA, PGA et PCL, notamment les poly(lactide-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) et poly(lactide-co-glycolide). Cette stratégie permet de combiner les qualités de plusieurs polymères et d'obtenir des caractéristiques intermédiaires. Le **PLCL** est surtout employé par l'une des rares équipes françaises (LEMETA - Nancy) travaillant sur l'ingénierie tissulaire du ligament [129, 132]. L'association du PLA et de la PCL a permis d'obtenir des structures textiles dotées de propriétés mécaniques de l'ordre de 150 à 200 MPa, c'est-à-dire proches de celles d'un LCA humain. Ce copolymère semble également constituer un bon support de culture cellulaire [129, 167]. Néanmoins, l'utilisation de ces matrices est encore limitée par leurs forces de rupture relativement faibles.

Des matrices textiles de **PLGA** ont également été développées par Laurencin *et al.* qui leur ont préféré le PLA et ses meilleures propriétés mécaniques et de cytocompatibilité [152, 168]. Le PLGA textile utilisé seul ne semble en effet pas adapté à la culture cellulaire [169, 170]. Dans la plupart des autres travaux, le PLGA est employé sous forme de textile dans des structures hybrides où il est associé à d'autres types de produits (soie, collagène) et de mise en forme (microéponge, *electrospinning*) [129, 143, 156, 171, 172].

On peut également mentionner l'utilisation d'autres polymères dégradables comme la polydioxanone qui perd rapidement ses propriétés mécaniques pendant la dégradation [151, 173], deux polymères développés par Kohn *et al.*, le poly(DTD DD) [174] et le poly(DTE carbonate) dont les propriétés mécaniques sont supérieures à celles du PLLA et préservées plus longtemps après dégradation dans du PBS [108, 175], ou encore de poly(éthylène glycol diacrylate) utilisé sous forme d'hydrogel pour améliorer les propriétés viscoélastiques d'une matrice textile de PLA.

En conclusion, de nombreux choix s'offrent aux chercheurs pour le développement de matrices ligamentaires en particulier parmi les polymères, qu'ils soient synthétiques ou d'origine naturelle. Toute la difficulté dans le choix du matériau réside dans le besoin d'avoir à la fois des propriétés mécaniques semblables à celles d'un ligament natif, une biocompatibilité suffisante pour que les cellules adhèrent et puissent régénérer les tissus et une cinétique de dégradation adaptée à la régénération tissulaire. Dans cette optique, les résultats les plus prometteurs semblent aujourd'hui être issus des travaux sur la soie et le PLLA. Cependant, ces résultats et particulièrement les propriétés mécaniques dépendent fortement de la mise en forme de la matrice. Les mises en forme existantes sont le sujet de la prochaine section.

3.2. Les architectures des matrices de régénération

3.2.1. Architectures textiles

Les ligaments et notamment le LCA sont des tissus capables de supporter de fortes charges mécaniques, principalement dans leur axe de travail. Leurs caractéristiques proviennent de leur composition et de leur structure, c'est-à-dire des fibres de collagène disposées pour la plupart longitudinalement avec de légères ondulations et pour quelques-unes dans des directions différentes afin d'exercer une force de rappel par entrelacement. Pour reproduire leurs propriétés, la recherche s'est donc tout naturellement orientée vers le développement de fibres et de structures textiles. Dans cette optique, trois types d'agencement textile se distinguent : les structures **torsadées**, **tissées**, **tricotées** et **tressées** (*Tableau I-9*).

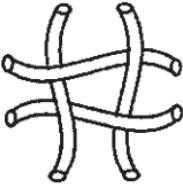
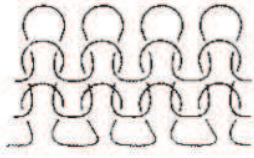

Structure	Tissé	Tricoté	Tressé
Géométrie			
Mobilité des fibres	limitée	très grande	limitée
Porosité	grande	très grande	grande

Tableau I-9 : Propriétés des structures textiles [108]

La simple organisation parallèle de fibres ne permet pas de générer d'interaction entre celles-ci ni de réelle modification des propriétés par rapport à une fibre seule. En revanche, une technique pourtant très simple de **torsadage** (enroulement des fibres sur elles-mêmes par torsion) permet d'obtenir des structures en corde se rapprochant sensiblement de l'architecture ligamentaire (*Figure I-20*). Le déroulement progressif de la torsade sous contrainte génère une *toe region* sur le profil déformation-contrainte de la matrice, réduisant ainsi les dommages liés à la fatigue et au fluage du matériau [108, 176]. Une densité de torsadage trop élevée peut cependant nuire à la structure en provoquant une diminution de ses propriétés de rupture (contrainte et déformation) et de sa résistance à l'abrasion [36]. Cela peut également réduire la porosité et ainsi gêner l'insertion et la colonisation cellulaire. Ce type de mise en forme a essentiellement été développé avec la soie [18, 136, 137] et le PLA [157].

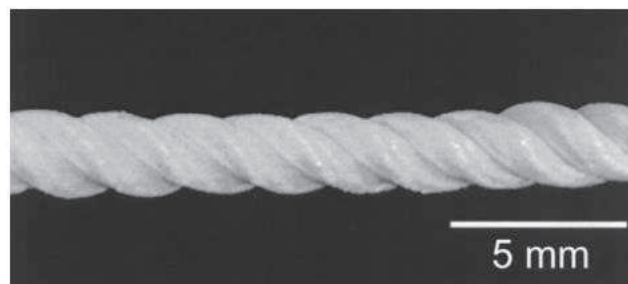


Figure I-20 : Corde constituée de 540 fibres de soie obtenue par torsadage [18]

La complexité des ligaments et de leur comportement mécanique a par la suite conduit les chercheurs à développer des mises en forme plus élaborées. Le **tissage**, qui consiste à

croiser à angle droit un ensemble de fibres parallèles (la chaîne) et un autre ensemble de fibres parallèles (la trame). Il est en fait peu employé dans les matrices ligamentaires dans la mesure où cet agencement favorise les propriétés mécaniques dans deux directions perpendiculaires, ce qui n'est pas cohérent avec le travail essentiellement uniaxial du ligament. Il peut par ailleurs provoquer fatigue et fluage et mener à des ruptures soudaines dues au faible renforcement structural [176]. Le **tricotage**, quant à lui, est obtenu par entrelacement de fibres et est constitué d'un élément de base, la maille [177] (**Figure I-21**). Cette stratégie adoptée avec la soie et le PLGA par Goh *et al.* [140-143, 172, 178] permet d'obtenir des structures très poreuses qui favorisent la colonisation cellulaire et la régénération tissulaire *in vivo*. Les limitations de ces travaux se trouvent pour l'instant dans les propriétés mécaniques qui restent inférieures à celles du LCA mais pourraient être suffisantes pour une sollicitation modérée du ligament avec par exemple des forces de rupture de l'ordre de 400 N 24 semaines après implantation chez le cochon [139]. La grande liberté de mise en forme offerte par le tricotage (type de point, maille, diamètre des fibres) devrait permettre la modulation des propriétés mécaniques et de la porosité [129, 130].

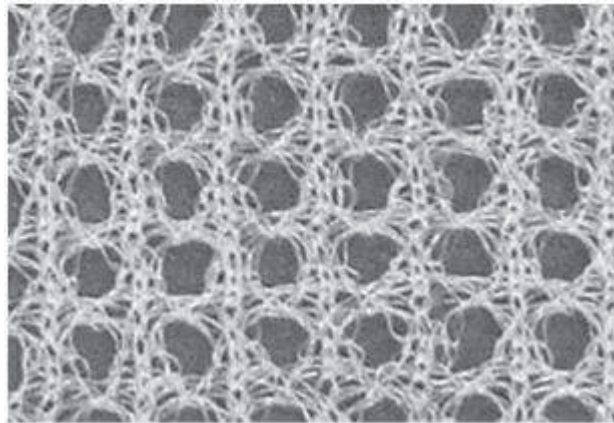


Figure I-21 : Matrice ligamentaire en soie tricotée [130]

Enfin, le **tressage** est aujourd'hui devenu l'une des techniques de mise en forme textile les plus étudiées pour le ligament. Cette structure plus complexe est obtenue par entrecroisement d'au moins trois fibres ou faisceaux de fibres [177]. Comparativement aux autres textiles, la tresse est dotée d'une grande stabilité physique. Elle est mécaniquement plus résistante mais sa densité de fibres la rend moins extensible et moins poreuse, ce qui peut être néfaste à l'intégration cellulaire puisqu'on estime que des tailles de pore respectives de l'ordre de 150 μm et de 200 à 250 μm sont préconisées pour la croissance des tissus osseux et des

tissus mous [179, 180]. Malgré ces inconvénients, le tressage a été expérimenté avec des polymères résorbables (PLA, PGA, PLGA et PLCL), y compris pour fabriquer des structures tridimensionnelles [132, 152, 154, 159, 162, 165, 168-170]. Etant donné la complexité de ce type d'architecture, la modélisation informatique est désormais un outil intéressant pour prévoir leur comportement et estimer l'influence des nombreux paramètres qui entrent en compte [132]. D'une manière générale, l'augmentation du nombre de couches de fibres et du diamètre des fibres ainsi que la diminution de l'angle de tressage sembleraient augmenter la rigidité et les contraintes supportées par la structure mais réduiraient son domaine d'élasticité. Ces effets ont d'ailleurs été exploités par Cooper *et al.* [154, 168] qui ont développé des matrices constituées de trois régions : les deux extrémités correspondent aux sites d'attachement osseux tandis que le centre correspond à la zone intra-articulaire [154]. L'angle de tressage des zones d'insertion est élevé afin de favoriser l'intégration osseuse et celui de la zone intra-articulaire est plus faible de manière à favoriser la régénération des tissus ligamentaires. C'est d'ailleurs à partir de cette architecture qu'a été développé le L-C Ligament[®] évoqué plus tôt. Le principal inconvénient des structures tressées reste leur faible extensibilité [132] bien que certains résultats semblent indiquer une augmentation de la déformation de rupture au cours de la dégradation [162].

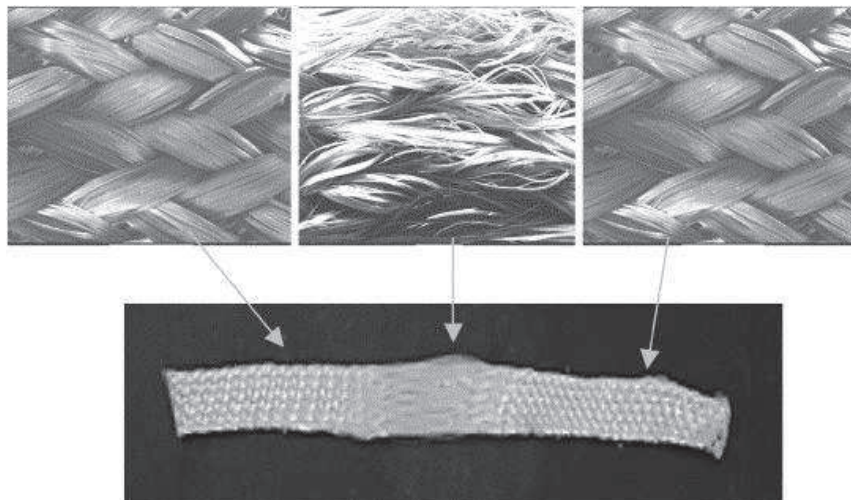


Figure I-22 : Matrice ligamentaire hétérogène en PLA tressé [168]

Certaines études font par ailleurs état de structures combinant plusieurs agencements textiles (**Figure I-23**), en particulier des combinaisons tresse-torsade développées par Freeman *et al.* [153, 155, 181]. Le but de cette association est de combiner l'extensibilité du torsadage et la résistance mécanique du tressage afin de s'approcher encore plus de la

structure du ligament natif et de son comportement mécanique [176]. Malgré des résultats encourageants, le comportement de ces matrices en relaxation n'était pas encore parfaitement adapté à l'application [181].

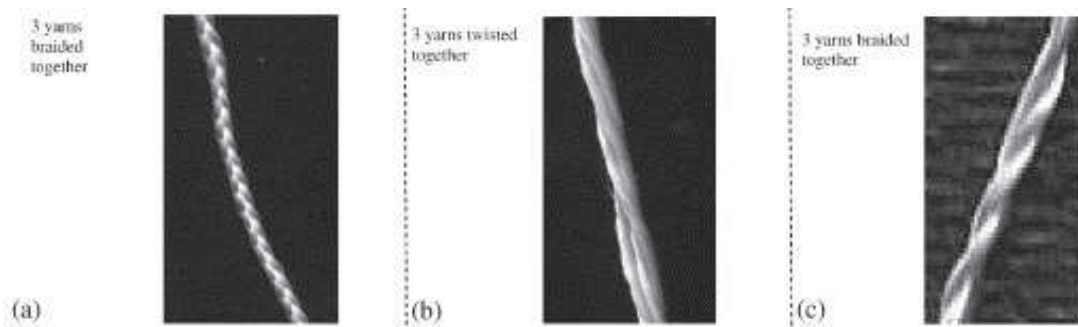


Figure I-23 : Matrices ligamentaires en PLA en tresse (a) torsade (b) et combinaison tresse-torsade (c) [153]

3.2.2. Autres procédés

Il existe de nombreux autres procédés utilisés pour la conception de matrices ligamentaires. L'*electrospinning* ou électrofilage (**Figure I-24**), une technique de mise en forme devenue très populaire dans les domaines des biomatériaux et de l'ingénierie tissulaire, permet de produire des fibres de diamètres micrométriques voire nanométriques grâce à l'application d'un champ électrostatique. Elle est par exemple régulièrement associée à des structures textiles classiques qui apportent leur intégrité mécanique dans le but d'améliorer la biocompatibilité de la matrice. De telles architectures microporeuses sont en effet proches de la morphologie des fibres de collagène constituant les ligaments, ce qui leur confère un caractère biomimétique et favorise fortement la colonisation et la différenciation cellulaires. Les fibres obtenues par *electrospinning* sont souvent déposées à la surface des matrices textiles [129, 143, 172], par exemple sous forme de faisceaux de fibres alignées qui sont ensuite tressés et plus rarement utilisés comme constituant de base de ces matrices [159]. Ce type de structure est cependant soumis à la faiblesse mécanique des microfibrilles et ne semble pour l'instant pas répondre aux exigences de l'application. Il en est de même pour les matrices basées uniquement sur le procédé d'*electrospinning* [158] même si l'apport d'ondulations aux microfibrilles permet d'améliorer les propriétés élastiques [160, 161].

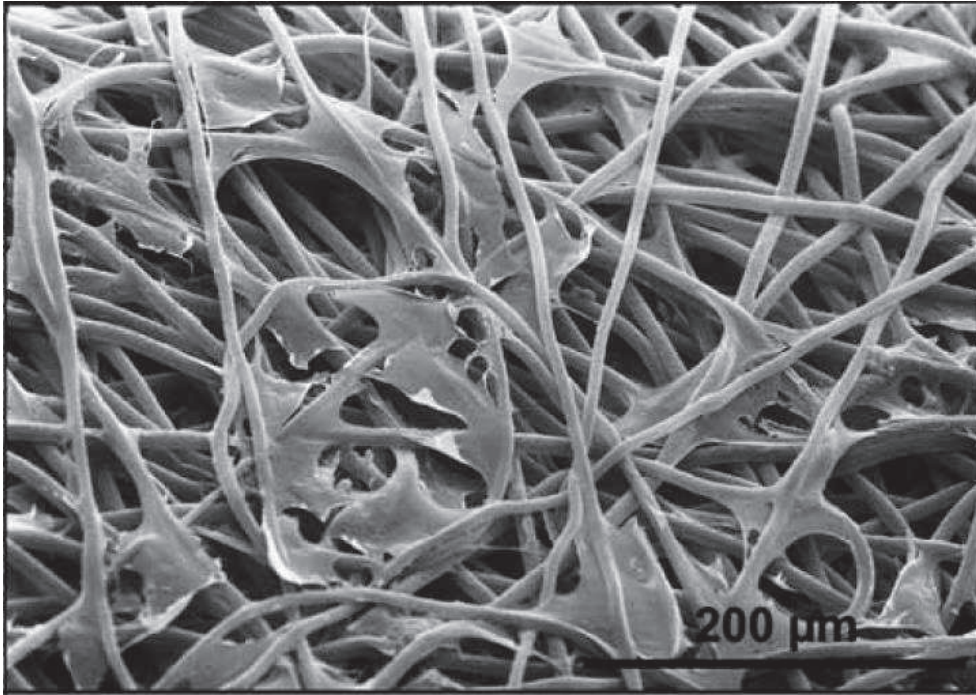


Figure I-24 : Observation au MEB de cellules souchesensemencées sur une matrice electrospinning [129]

On peut également mentionner l'incorporation d'**hydrogels** dans des supports ligamentaires, soit pour apporter des propriétés viscoélastiques en créant une structure de type composite fibre/matrice [155], soit pour assurer une fonction de vectorisation de cellules ou d'autres composés chimiques comme des facteurs de croissance [119, 155, 167, 182]. D'autres structures microporeuses obtenues par **lyophilisation** ou encore par **salt leaching** sont également ajoutées aux textiles pour favoriser la colonisation cellulaire [130, 139-142, 155, 167].

3.3. Les sources cellulaires

Dès lors que la matrice de régénération est conçue, l'aspect cellulaire est le deuxième élément essentiel dans l'ingénierie tissulaire. Là encore, plusieurs possibilités s'offrent aux chercheurs dans ce domaine, le but étant non seulement d'obtenir une matrice colonisée par les cellules mais aussi que celles-ci conduisent à la reformation des tissus souhaités. Idéalement, les cellules choisies devraient pouvoir être prélevées directement chez le patient afin d'éliminer le risque de réaction immunitaire.

3.3.1. Fibroblastes

Tout comme les matériaux d'origine naturelle paraissent être un choix évident pour la conception de la matrice, l'utilisation de fibroblastes, cellules constitutives des ligaments et tendons *a priori* dotées des caractéristiques phénotypiques nécessaires à la synthèse de la MEC, semble être un choix tout naturel pour la régénération tissulaire. Dans ce contexte, les recherches se sont orientées vers des fibroblastes de peau [110, 119, 169, 174, 175] mais surtout de ligaments (ligamentocytes) et tendons (ténocytes) comme le tendon rotulien [147, 148, 154, 155, 167, 183], le ligament collatéral tibial [154, 165] et évidemment le LCA [140, 142, 144, 152, 154, 156, 165, 168, 169, 171, 184, 185]. Bien que certaines de ces études aient mis en évidence l'attachement et la prolifération de fibroblastes sur des matrices ligamentaires ainsi que l'expression de gènes traduisant la synthèse de MEC riche en collagènes [154, 169], ces cellules ont l'inconvénient d'être relativement quiescentes et d'avoir un potentiel de "différenciation" (ou plus exactement de spécialisation) limité [186]. Cooper *et al.* ont conclu que parmi les différentes sources ligamentaires et tendineuses de fibroblastes, ceux provenant du LCA semblaient être les meilleurs candidats des points de vue morphologique et phénotypique [154]. D'autres résultats suggèrent en revanche que les fibroblastes de LCA ne seraient pas adéquats pour cette application en raison d'une faible prolifération et d'une capacité d'adaptation limitée à différentes conditions tandis que les fibroblastes de peau ne présenteraient pas ces inconvénients [169]. De plus, dans le cadre de l'utilisation de cellules autologues, le prélèvement de fibroblastes sur des ligaments intra-articulaires comme les ligaments croisés induit une intervention par arthroscopie qui implique tous les inconvénients et risques chirurgicaux traditionnels (anesthésie, infection, douleur, cicatrisation). Ce problème ne se pose évidemment pas lors du prélèvement de fibroblastes de peau.

3.3.2. Cellules souches

Les cellules souches, qui ont donné un nouvel essor à l'ingénierie tissulaire, sont des cellules indifférenciées caractérisées par leur capacité d'autorenouvellement et capables de donner naissance à au moins un lignage cellulaire également. Les facultés de prolifération et de différenciation de ces cellules ont tout naturellement attiré l'attention des chercheurs pour la régénération tissulaire. Au sein des cellules souches, on distingue les cellules totipotentes (capables d'engendrer la totalité des cellules et tissus de l'embryon, il s'agit en fait de la cellule-œuf ou zygote), pluripotentes (capables de donner naissance aux cellules des trois

feuillet embryonnaires), multipotentes (capables de donner un nombre limité de lignages cellulaires) et unipotentes (ne pouvant se différencier qu'en un type cellulaire).

Parmi ces cellules, les **cellules souches embryonnaires** (CSE) sont des cellules pluripotentes dotées d'excellentes capacités de prolifération et de différenciation [187]. Leur utilisation est cependant problématique en raison des considérations éthiques qu'elles soulèvent et des réglementations drastiques qui en découlent. A l'heure actuelle, les recherches en ingénierie tissulaire impliquant l'utilisation de CSE sont donc fortement limitées.

En revanche, ces problèmes éthiques ne se posent pas avec les cellules souches adultes. Parmi elles, les **cellules souches mésenchymateuses** (CSM) peuvent se différencier en un large spectre de cellules de tissus spécialisés (**Figure I-25**) comme l'os, le cartilage, le muscle, le tissu adipeux ou encore le tendon et le ligament [188]. On peut les trouver dans le tissu synovial, le placenta, le cordon ombilical, de manière plus anecdotique dans la peau, les muscles et même les tendons mais surtout dans la moelle osseuse (on parle alors de CSM médullaires) et dans les tissus adipeux (CSM adipoxytaires) [189].

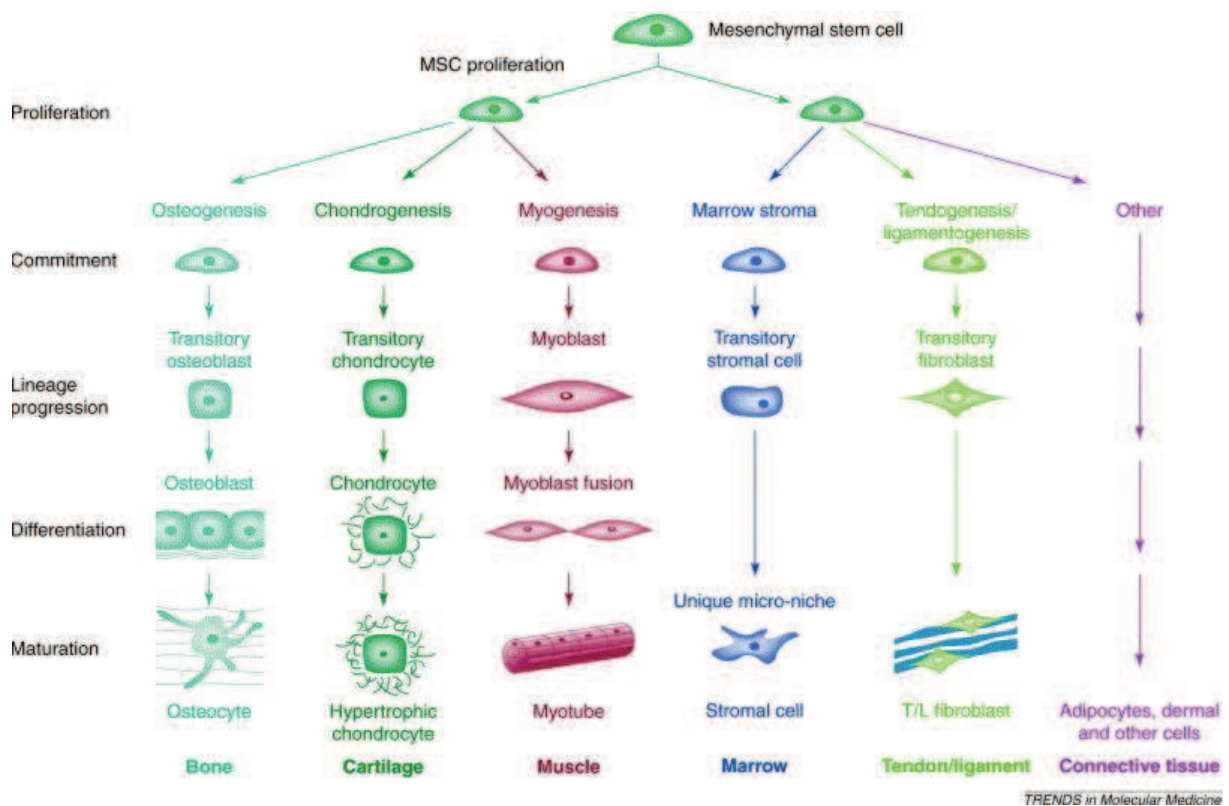


Figure I-25 : Processus de différenciation des CSM [188]

Le prélèvement des CSM par ponction de la crête iliaque au niveau du bassin est d'ailleurs une technique relativement simple et courante. La seule difficulté liée à cette source de CSM réside dans la faible concentration de ces cellules dans la moelle, estimée entre 0,001 et 0,1 % [190], c'est pourquoi les CSM isolées de tissus adipeux sont de plus en plus utilisées. Elles y sont en effet présentes en quantité plus importante (près de mille fois supérieure).

Quelle que soit la source, l'obtention de CSM en quantités suffisantes pour des applications cliniques nécessite de passer par une phase d'expansion *in vitro*. Malgré cet inconvénient, les CSM sont devenues très populaires dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, y compris appliquée aux ligaments et tendons. Bien que les marqueurs de différenciation des CSM vers un phénotype de ligamentocyte ou ténocyte soient aujourd'hui relativement mal connus (il existe un certain nombre de marqueurs caractéristiques comme les collagènes de types I et III, la ténascine-C ou scleraxis mais pas de marqueur spécifique), de nombreux travaux de régénération ligamentaire s'appuient actuellement sur l'expansion et l'orientation de la différenciation de ces CSM sur différents types de matrices ligamentaires [18, 129-131, 135-141, 143, 157, 159, 170, 172, 185, 191-194]. Certaines études réalisées afin de comparer le potentiel de régénération de fibroblastes de différentes sources et de CSM ont révélé un taux de prolifération, une production de collagènes et une expression de gènes caractéristiques plus élevés avec les CSM, les désignant ainsi comme le meilleur choix pour cette application [142, 156, 169, 195]. On peut mentionner certains travaux présentant une stratégie de co-culture de fibroblastes et de CSM [140, 196, 197] dont les résultats ont par exemple montré une stimulation de la prolifération et de l'expression de collagènes de type I et III et de ténascine-C chez les CSM cultivées en présence de fibroblastes de LCA. Cette stimulation serait liée à la sécrétion par les fibroblastes de facteurs de croissance. L'utilisation de tels facteurs pour stimuler les cellules dans le cadre de la régénération ligamentaire sera évoquée ultérieurement.

Enfin, il paraît important d'évoquer les travaux qui ont abouti en 2012 au prix Nobel de Physiologie ou Médecine partagé par John Gurdon et Shinya Yamanaka. Ces travaux sur l'induction des cellules souches pluripotentes (iPSC) et la reprogrammation de cellules matures ont permis d'obtenir des cellules pluripotentes à partir de cellules déjà différenciées [198-201]. Ces résultats ouvriront sans aucun doute la porte à d'importants progrès en biologie cellulaire et tout particulièrement pour l'ingénierie tissulaire. A l'heure actuelle, il n'existe pas encore d'exemple d'utilisation de ces iPSC pour la régénération du ligament. Etant donné que les CSM sont les cellules progénitrices naturelles des ligamentocytes et

qu'elles sont plus simples à isoler et à cultiver, elles demeurent pour l'instant plus avantageuses.

3.4. Les modes de stimulation

Si l'affinité des cellules avec la matrice ligamentaire choisie peut permettre une bonne adhésion cellulaire et éventuellement une bonne prolifération, elle suffit rarement à induire l'orientation phénotypique voulue, voire la différenciation. La plupart du temps, pour aboutir à une différenciation cellulaire, il est nécessaire d'appliquer des conditions de culture bien particulières aux cellules présentes sur le support de régénération. Plusieurs types de stimulations sont possibles pour parvenir à de tels résultats.

3.4.1. Stimulations biochimiques

Il existe un grand nombre de facteurs biochimiques et physico-chimiques permettant d'induire la différenciation cellulaire ou d'augmenter la production des molécules caractéristiques du phénotype différencié. On sait par exemple que la modification du taux de **dioxygène** dans l'atmosphère de culture peut favoriser soit la prolifération soit la synthèse des collagènes par les fibroblastes de LCA [202]. L'**acide ascorbique** (AA) et son dérivé le L-ascorbate-2-phosphate (A2P) sont également connus pour stimuler la prolifération et la synthèse de collagènes par les fibroblastes de LCA [203] ou la différenciation fibroblastique de CSM [186].

Durant le cycle de vie cellulaire, les cellules sont par ailleurs soumises à des signaux appropriés à des moments bien précis qui permettent de déclencher des réactions spécifiques : croissance, prolifération, différenciation ou synthèse de MEC. La plupart de ces signaux proviennent de composés appelés **facteurs de croissance** ou **de différenciation**, des protéines responsables de la régulation de la croissance et des fonctions cellulaires [204].

Ces facteurs sont très largement employés dans l'ingénierie tissulaire des ligaments et tendons pour moduler les réactions cellulaires [136, 137, 143, 170, 184, 192]. Parmi les effets induits, on peut noter la prolifération cellulaire, la synthèse de MEC et de protéines associées (en particulier les collagènes) et l'amélioration des propriétés mécaniques des néotissus formés (*Tableau I-10*).

Facteurs de croissance	Effets induits dans les tissus
<p style="text-align: center;">EGF <i>Epidermal Growth Factor</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - prolifération - synthèse de MEC
<p style="text-align: center;">FGF <i>Fibroblast Growth Factor</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - prolifération - synthèse de MEC - synthèse de collagène - vascularisation - rigidification
<p style="text-align: center;">GDF <i>Growth Differentiation Factor</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - prolifération - synthèse de MEC - migration cellulaire - renforcement mécanique - production de néotissus
<p style="text-align: center;">IGF <i>Insulin-like Growth Factor</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - prolifération - synthèse de MEC - synthèse de collagène
<p style="text-align: center;">PDGF <i>Platelet Derived Growth Factor</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - prolifération - synthèse de MEC - vascularisation - rigidification - amélioration des propriétés structurales
<p style="text-align: center;">TGF-β <i>Transforming Growth Factor-β</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - prolifération - synthèse de collagène

Tableau I-10 : Principales familles de facteurs de croissance utilisés en ingénierie tissulaire du ligament [10, 17, 151, 186]

En ce qui concerne la différenciation des CSM vers les différents lignages, on peut mettre en évidence l'apparition de cellules différenciées grâce à l'identification et la quantification de gènes (et des protéines) spécifiques des différents phénotypes. En ce qui concerne la différenciation en ligamentocyte, les gènes exprimés ne sont que peu spécifiques (cf. § I.3.3.2) [143, 170, 192]. Les facteurs de croissance appartenant aux familles FGF et

TGF- β semblent être les plus employés pour cette différenciation. Moreau *et al.* (de l'équipe de Kaplan) ont notamment réalisé des travaux portant sur la différenciation de CSM grâce à l'application séquentielle de facteurs de croissance [17, 136, 137, 186, 205]. Cette stratégie reposant sur l'idée que l'administration séquentielle de certains facteurs à des moments précis du processus de différenciation permettrait d'optimiser la différenciation des cellules a révélé une efficacité particulière avec des associations EGF/TGF- β ou bFGF/TGF- β .

3.4.2. Stimulations mécaniques

La seconde méthode classiquement utilisée pour induire la différenciation ou stimuler la cellule différenciée est la stimulation mécanique. Les sollicitations mécaniques, au même titre que les facteurs de croissance, comptent parmi les signaux qui affectent la croissance et le développement des tissus ligamentaires. De manière à simuler les mouvements subis par l'organisme et ainsi se rapprocher de l'environnement réel des cellules, de nombreux appareillages de stimulation mécanique ont été développés pour les matrices ligamentaires. Il a été montré que de telles stimulations appliquées à des fibroblastes de différentes sources favorisent l'alignement des cellules ainsi que l'expression des collagènes de type I et III, de ténascine-C et de fibronectine [204, 206-208], y compris en l'absence de facteurs de croissance spécifiques [18, 183]. Cette stratégie a donc été appliquée à des fibroblastes ensemencés sur divers supports de régénération (**Figure I-26**), parfois en association avec l'administration de facteurs de croissance, afin de favoriser la synthèse des protéines de la MEC et l'orientation phénotypique des cellules [119, 161, 165, 204, 209, 210]. Les déformations imposées à ces supports sont typiquement comprises entre 5 et 10 % à des fréquences ne dépassant généralement pas 1 Hz.

Pour induire la différenciation des CSM, de nombreuses expériences ont en effet suggéré que les molécules de régulation comprenant notamment les facteurs de croissance et l'application de contraintes mécaniques agissent de concert pour déterminer le type de tissu conjonctif formé par différenciation des CSM [8]. Cela serait lié au déclenchement de récepteurs d'étirement présents à la surface des cellules [195]. Comme pour les fibroblastes, on trouve de nombreux travaux sur la stimulation de supports ensemencés avec des CSM. Là encore associées à des facteurs de croissance dans certains cas, ces sollicitations semblent avoir favorisé l'expression de gènes et la synthèse de protéines typiques de la MEC de

ligamentocytes [211-213] ce qui laisse supposer que les CSM se sont bien différenciées dans ce sens [136, 138, 209].

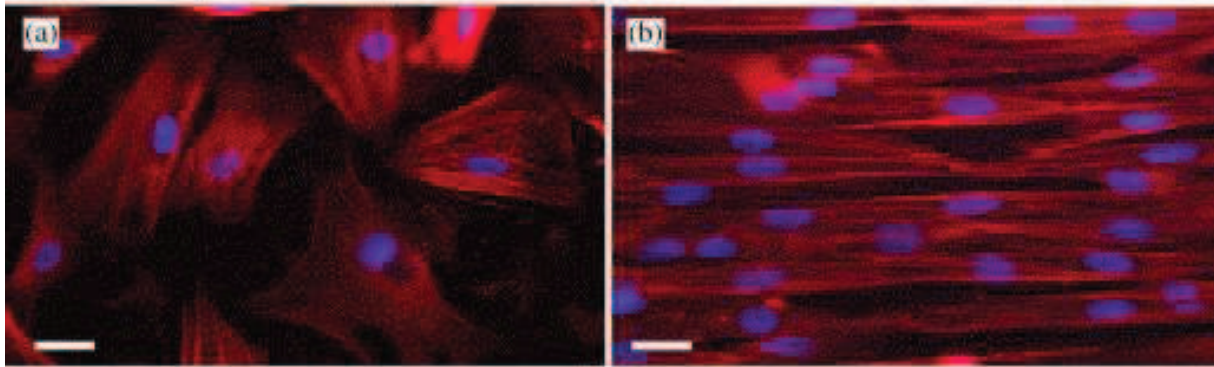


Figure I-26 : Observation en MCF (filaments d'actine en rouge et noyaux en bleu) de fibroblastes non stimulés (a) et stimulés mécaniquement (b) (barre d'échelle : 10 µm) [210]

L'application de stimulations mécaniques sur des matrices de régénération ensemencées avec des cellules présente cependant certaines difficultés. La manipulation de ces objets requiert en effet de maintenir des conditions stériles afin d'éviter toute contamination des échantillons. Cette nécessité ainsi que la popularisation de cette technique et la volonté de développer des systèmes capables non seulement d'appliquer des sollicitations mécaniques toujours plus complexes mais aussi de fonctionner sur plusieurs échantillons ont conduit à la mise au point et à la commercialisation de systèmes appelés **bioréacteurs** (*Figure I-27*).

Les bioréacteurs sont conçus pour simuler au mieux les conditions environnementales des cellules au sein d'un organisme et s'inscrivent dans trois catégories : les bioréacteurs statiques, à perfusion et à stimulations mécaniques. Pour les plus complets d'entre eux, ils permettent de maintenir les échantillons et les cellules dans une atmosphère contrôlée, de maîtriser l'introduction du milieu de culture et des éventuels facteurs de croissance et bien sûr d'appliquer les contraintes mécaniques souhaitées (uniaxiales ou multiaxiales, traction, compression, torsion ou leur combinaison), et cela pendant des durées importantes (plusieurs semaines) [138, 195, 211, 212, 214-216]. Depuis la naissance de ces systèmes, de nombreuses sociétés ont développé leurs propres bioréacteurs qui sont désormais commercialisés [217, 218]

Cependant, la plupart des équipes de recherche travaillant sur l'ingénierie tissulaire du ligament préfèrent développer elles-mêmes leurs appareillages, certainement avec la volonté de les concevoir aussi adaptés que possible à l'application, mais aussi en raison du coût élevé des systèmes commercialisés. Il faut également être conscient des inconvénients présentés par les bioréacteurs. Un certain nombre d'entre eux, généralement encombrants, nécessitent par exemple une installation dans un incubateur pour pouvoir rester sous atmosphère contrôlée. Le nombre de supports pouvant être stimulés simultanément est également limité par le nombre de chambres de culture dont le bioréacteur est équipé, les appareils dotés de nombreuses chambres étant bien évidemment les plus coûteux.



Figure I-27 : Bioréacteur Bose®
ElectroForce 5200 Biodynamic

3.5. Conclusions

L'ingénierie tissulaire, une discipline jeune et en plein essor, mobilise de nombreux domaines scientifiques comme la chimie et la mise en forme des matériaux, la biologie cellulaire et moléculaire et même la conception mécanique de bioréacteurs dans le but de régénérer des tissus endommagés. Les ligaments et tendons en général, et le LCA en particulier, figurent parmi les tissus qui attirent très largement l'attention des chercheurs de ce domaine.

Reconstruire ces tissus par le biais de l'ingénierie tissulaire est évidemment une tâche très complexe puisque de très nombreux paramètres sont à prendre en compte. Plusieurs choix s'offrent à l'ingénieur tissulaire concernant la matrice de régénération d'une part et la culture cellulaire d'autre part.

La matrice, qui joue le rôle de support de régénération, doit être conçue de manière à être biocompatible et capable d'assurer la fonction mécanique du tissu si elle est destinée à être implantée avant la régénération du ligament. Pour cela, le choix du ou des matériaux la

constituant et de leur structure est d'une importance primordiale dans la mesure où ces paramètres lui conféreront ses propriétés mécaniques et son affinité avec les cellules.

L'aspect cellulaire constitue le deuxième facteur déterminant de l'ingénierie tissulaire. La bonne association du type cellulaire et des conditions de culture et de stimulation pourra mener à la formation de tissus fonctionnels. Le choix pourra se porter sur les fibroblastes, cellules constitutives des ligaments et tendons, ou sur des cellules souches indifférenciées. Les stimulations, qu'elles soient de nature biochimique ou mécanique, permettront d'induire les réactions appropriées de la part de ces cellules : prolifération, synthèse de MEC, orientation phénotypique et différenciation.

Nous avons pu constater que l'une des problématiques dans la conception de la matrice de régénération réside dans l'obtention de propriétés mécaniques adéquates et plus particulièrement de l'élasticité. Bien qu'elle puisse être modulée par le choix du matériau utilisé (naturel ou synthétique) et de sa mise en forme (la plupart du temps textile), les études menées actuellement peinent à reproduire cette élasticité naturelle des ligaments. C'est pourquoi nous allons nous intéresser à des matériaux alternatifs. Dans le domaine des polymères, la recherche de propriétés élastiques mène bien souvent au développement de produits appartenant à une famille bien particulière : les élastomères.

La prochaine section sera donc consacrée à la conception de polymères élastomères utilisables en ingénierie tissulaire et dotés de deux propriétés bien spécifiques : la biocompatibilité et la biodégradabilité.

4. Les élastomères dégradables pour l'ingénierie tissulaire

Le mot "élastomère" est un terme employé pour désigner, d'une manière générale, les caoutchoucs, qu'ils soient naturels ou synthétiques. Il s'agit de polymères constitués de réseaux macromoléculaires qui leur confèrent des propriétés mécaniques bien particulières : ils sont flexibles (rigidité relativement basse), hautement déformables (capables de subir d'importantes déformations sans dommages, dotés d'une déformation de rupture au-delà de 200 %) et élastiques (capables de retourner à leur forme et à leur taille d'origine après déformation) [76]. Néanmoins, de nombreux matériaux considérés comme élastomères ne remplissent pas exactement ces critères et la définition la plus répandue s'étend aux polymères capables de retrouver leur forme initiale après une déformation importante.

La manière la plus courante d'obtenir des élastomères consiste à créer une structure macromoléculaire réticulée. La première technique de réticulation mise au point a été la vulcanisation, procédé découvert accidentellement par Goodyear en 1839 qui consiste à générer des ponts disulfures entre les chaînes du polymère (du latex naturel dans le cas de Goodyear). C'est grâce à cette réticulation qui lie les macromolécules entre elles et s'oppose au glissement des chaînes qu'un élastomère possède une réversibilité des déformations (*Figure I-28*).

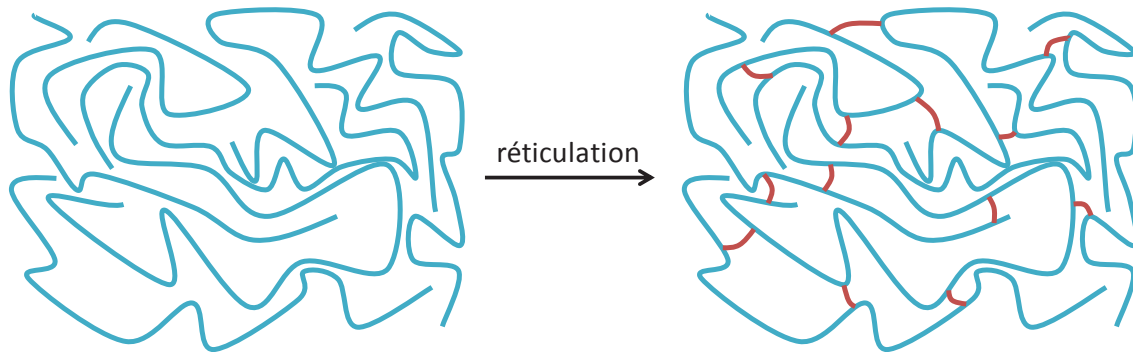


Figure I-28 : Obtention d'un élastomère par création de ponts de réticulation

Les élastomères sont aujourd'hui très répandus dans notre société et leurs propriétés mécaniques uniques les rendent particulièrement attrayants pour des applications qui nécessitent des matériaux élastiques (c'est-à-dire capables de retrouver leurs dimensions initiales après déformation), notamment dans le domaine biomédical. La difficulté majeure ne vient cependant pas de l'obtention de ces propriétés élastiques mais de la volonté de les obtenir tout en maintenant la biocompatibilité du matériau destiné à être implanté dans un organisme ainsi que sa biorésorbabilité dans le cadre d'une utilisation en ingénierie tissulaire.

Plusieurs stratégies ont toutefois été mises au point afin de développer de tels élastomères dégradables biocompatibles. Nous allons nous intéresser aux deux grandes familles d'élastomères utilisées en ingénierie tissulaire et particulièrement aux élastomères obtenus à partir des polymères synthétiques dégradables évoqués précédemment (cf. § I.2.2.4). Ces deux familles sont les élastomères thermoplastiques (TPE) obtenus par réticulation physique et les élastomères thermodurcissables obtenus par réticulation chimique.

4.1. Elastomères thermoplastiques

Contrairement aux polymères vulcanisés dont les chaînes sont liées de manière covalente, les TPE sont réticulés physiquement par des liaisons hydrogène, des forces dipolaires, des régions cristallines ou au contraire par des domaines vitreux. En dehors du cas de la liaison hydrogène qui est en fait le moins répandu, la réticulation physique est liée à une structure constituée de deux microphases : l'une d'entre elles apporte de la flexibilité (la phase amorphe à l'état caoutchoutique) tandis que l'autre (la phase cristalline ou la phase amorphe à l'état vitreux) est rigide et joue le rôle de réticulant [219]. Cette composition apporte leurs propriétés élastiques aux TPE tout en leur conférant un avantage indéniable. En l'absence de liaisons covalentes entre les chaînes de polymère, un simple chauffage permet en effet de casser cette réticulation physique et ainsi de faire fondre le produit. Comme les polymères thermoplastiques classiques, ces élastomères conservent donc la possibilité d'être aisément mis en forme, ce qui facilite la fabrication d'objets de formes et dimensions diverses [220].

La synthèse de copolymères à blocs à partir des polyesters aliphatiques dégradables classiquement utilisés dans le domaine des biomatériaux (PLA, PGA, PCL) est par exemple un moyen d'obtenir des propriétés élastomères, en particulier la synthèse de copolymère multiblocs obtenus par exemple grâce à des réactions de couplage [219, 221, 222]. Dans ce cas, le PLA et le PGA, polymères au comportement plastique, jouent le rôle des segments rigides tandis que la PCL prend celui du segment plus flexible. Il peut en résulter un TPE présentant de plus des propriétés de dégradation modulables grâce au contrôle de la composition du copolymère.

Des résultats semblables peuvent être obtenus avec les polyhydroxyalcanoates (PHA) d'origine bactérienne dont la cristallinité est d'autant plus importante que la chaîne latérale le constituant est courte. On peut préparer un copolymère à base de segments PHB très cristallins au comportement fragile et PHV moins cristallins, dotés de chaînes flexibles et d'un comportement plus élastique. Cette association permet de compenser partiellement la rigidité du PHB et la cytotoxicité du PHV [223]. Les propriétés mécaniques de ce copolymère, le PHBV, restent tout de même élevées en comparaison de celles des tissus biologiques mais l'introduction des motifs hydroxyvalérate diminue la biocompatibilité en causant des réactions inflammatoires importantes [224, 225].

L'une des techniques les plus employées pour préparer des TPE dégradables consiste à développer des polyuréthanes (PU). Un PU est obtenu par polyaddition d'un isocyanate (généralement un diisocyanate) et d'un alcool au moins bifonctionnel (**Figure I-29**). Cette stratégie peut aussi être appliquée à des polyesters aliphatiques comme le PLA et la PCL à condition qu'ils portent au moins deux fonctions hydroxyle terminales [226]. L'utilisation d'un isocyanate ou d'un polymère portant plus de deux groupements fonctionnels (par exemple avec un polymère en étoile) pourra conduire à la formation d'une structure réticulée chimiquement.

Les propriétés élastomères d'un PU peuvent être améliorées par extension de chaîne grâce à l'utilisation d'un diol ou d'une diamine qui pourront réagir avec les groupements isocyanate libres et ainsi mèneront respectivement à la formation d'un PU ou d'un poly(uréthane-urée) (PUU) "allongés" (*extended chain*) (**Figure I-29**). Ces polymères étendus seront alors constitués de segments flexibles (le polymère diol) et de segments rigides (les segments formés par les isocyanates et par les groupements d'extension de chaîne) capables de s'associer entre eux pour générer des nanophases et de la réticulation physique [227, 228].

Une nouvelle fois, cette stratégie peut être appliquée aux polyesters dégradables (PLA, PGA, PCL, PHA) pourvu qu'ils soient porteurs de groupements hydroxyle terminaux et qu'ils soient suffisamment courts [229-237]. La diversité des polymères, des isocyanates et des extenseurs de chaîne utilisables fait que l'on peut synthétiser de très nombreux PU ou PUU différents avec une très large gamme de propriétés mécaniques. Leur point commun reste généralement l'élasticité. L'un des inconvénients des PU et PUU vient de leur toxicité liée aux isocyanates employés pour leur synthèse, soit parce qu'ils étaient présents à l'état de trace à l'issue de la réaction, soit à cause des produits de dégradation du polymère [238, 239].

L'utilisation d'isocyanates aromatiques pose particulièrement problème. Dans le but de préserver au maximum la biocompatibilité du matériau, on privilégiera les isocyanates aliphatiques tels que la 1,4-butanediamine (putrescine), la lysine diisocyanate voire l'hexaméthylènediisocyanate [219, 228].

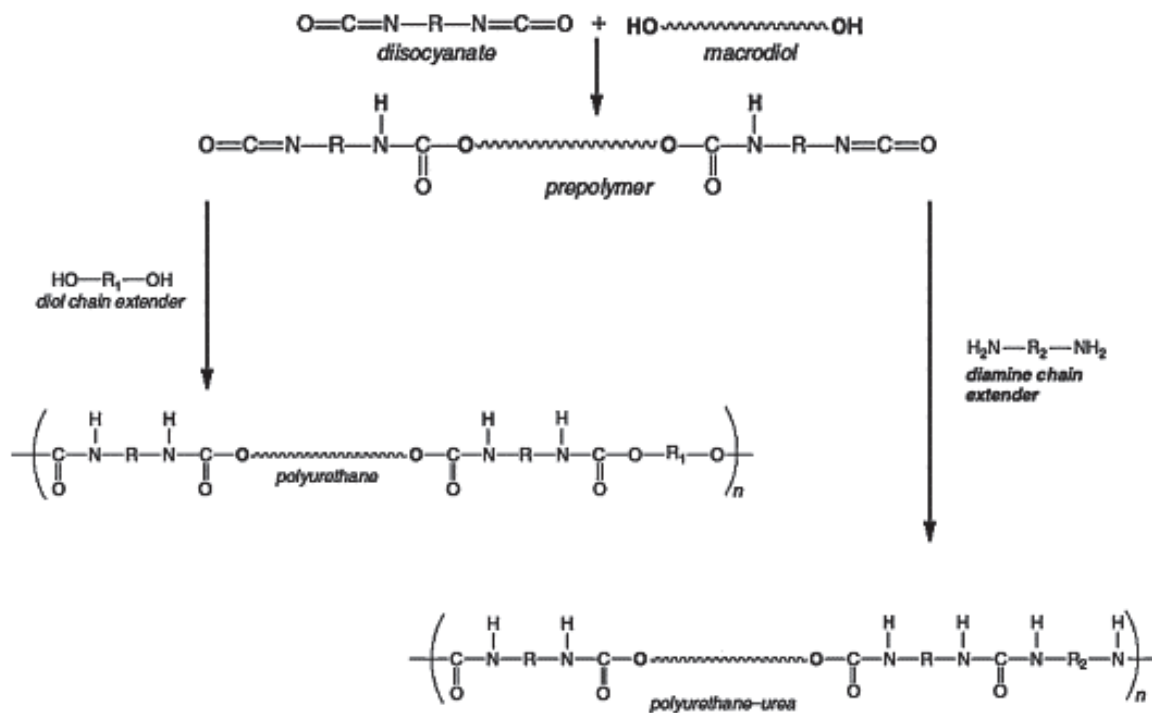


Figure I-29 : Principe de l'extension de chaîne appliqué à un PU [219]

Elastomère	\overline{Mn} (kg/mol)	E (MPa)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
PLA-PHB-PLA	12 - 30	30 - 160	10 - 15	86 - 200
PLA-PTMC-PLA	19 - 27	1 - 467	0,1 - 21	100 - 800
PTMC-PDLA dibloc	260 - 290	4 - 1100	1 - 38	x
PLLA-PCL multibloc	40 - 50	1 - 221	0,001 - 38	468 - 1170
PLA-PEG-PLA allongé	x	9 - 214	4 - 31	900 - 1800
PLA-PTMC-PLA allongé	21 - 32	x	x	200 - 300
PLLA-PCL-PLLA allongé	89 - 124	30	30 - 34	600 - 1600

x = information non disponible

Tableau I-11 : Exemples de copolymères TPE [227, 228]

4.2. Elastomères thermodurcissables

La seconde voie de réticulation des polymères dégradables, qui est en fait la plus courante, est la voie chimique. La création de ponts de réticulation entre les chaînes macromoléculaires, comme c'est le cas lors d'une vulcanisation, est en effet le moyen le plus direct de synthétiser un élastomère. Cette réticulation chimique peut être réalisée de différentes manières, notamment en faisant réagir entre eux des monomères polyfonctionnels ou en faisant réagir un agent de réticulation polyfonctionnel avec des groupements réactifs situés en bout de chaîne ou le long de la chaîne d'un polymère [219].

Les exemples les plus courants d'élastomères obtenus par polymérisation de monomères polyfonctionnels (**Figure I-30**) sont les polyesters synthétisés à partir de polyols (glycérol, érythritol, xylitol, mannitol, sorbitol, etc) et de polyacides carboxyliques (acide sébacique, acide citrique) [240-245]. Si ces polymères possèdent généralement une très bonne biocompatibilité (en particulier dans le cadre de l'utilisation de monomères métabolites), la plupart d'entre eux présentent une résistance mécanique relativement faible (**Tableau I-1**) et une dégradation rapide, ce qui limite pour l'instant leur application à l'ingénierie tissulaire de tissus mous tels que les vaisseaux sanguins ou les tissus musculaires [219, 246].

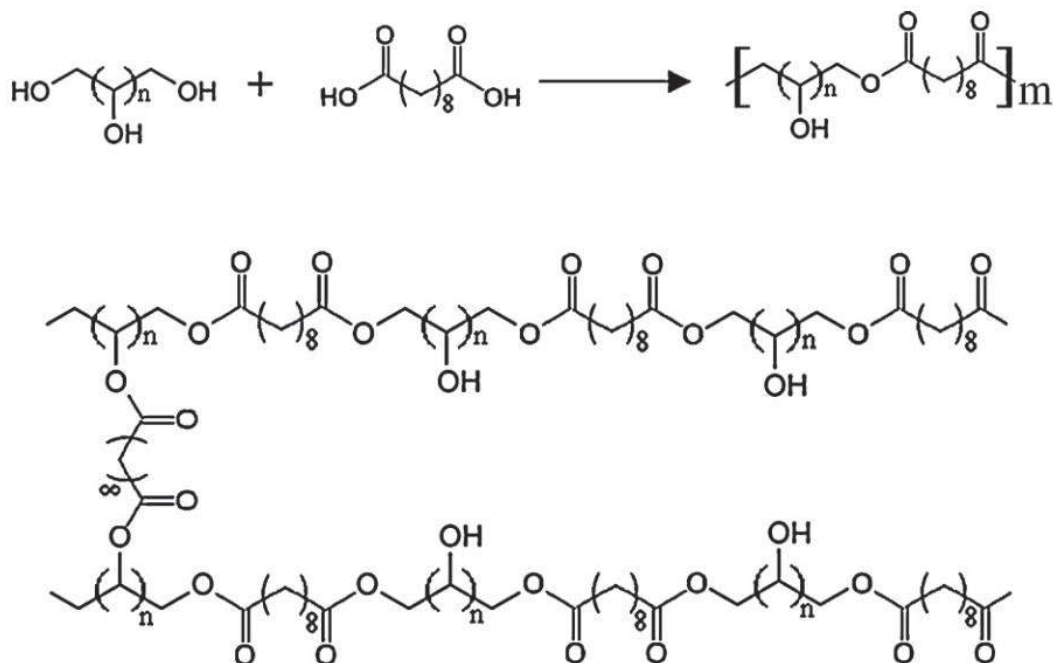


Figure I-30 : Synthèse d'une structure réticulée à partir d'acide sébacique et d'un triol [219]

Polyol	E (MPa)	σ_r (MPa)	ε_r (%)
Glycérol	0,05 - 1,5	0,3 - 1,5	40 - 500
Xylitol	0,8 - 5,3	0,5 - 1,5	30 - 200
Mannitol	0,4 - 2,7	0,6 - 1,2	66 - 200
Sorbitol	0,2 - 380	0,8 - 18	10 - 50

Tableau I-12 : Exemples de polyesters à base de polyols et d'acide sébacique [219]

La seconde stratégie de réticulation chimique repose sur l'utilisation d'espèces déjà polymérisées et porteuses de fonctions réactives. La difficulté avec les polyesters aliphatiques dégradables comme le PLA et la PCL est le manque de réactivité chimique des chaînes du polymère à l'exception des fonctions terminales, généralement des groupes hydroxyle et acide carboxylique. La synthèse de ces polymères par amorçage avec un diol permet d'obtenir un produit doté de deux hydroxyles terminaux. De nombreux procédés de réticulation de ces polymères consistent à greffer des composés photoréactifs sur ces hydroxyles terminaux [247-252]. Les alcènes, les alcynes, les thiols et les azotures figurent parmi les composés susceptibles de réagir sous irradiation UV qui sont particulièrement employés dans ce sens.

Ce type de réticulation a notamment été étudié au sein de notre laboratoire [253] sur des copolymères de PLA et de poly(éthylène glycol) (PEG). Des triblocs PLA-PEG-PLA de faibles masses molaires ($\overline{Mn} \approx 3000$ g/mol) ont en effet été synthétisés et leurs extrémités de chaînes fonctionnalisés par réaction avec le chlorure de méthacryloyle. Les polymères méthacrylés ainsi obtenus ont ensuite été réticulés sous irradiation UV avec deux agents réticulants différents, la 2,4,6-triallyloxy-1,3,5-triazine (TT) et le pentaérythritol triallyle éther (PETAE) (**Figure I-31**).

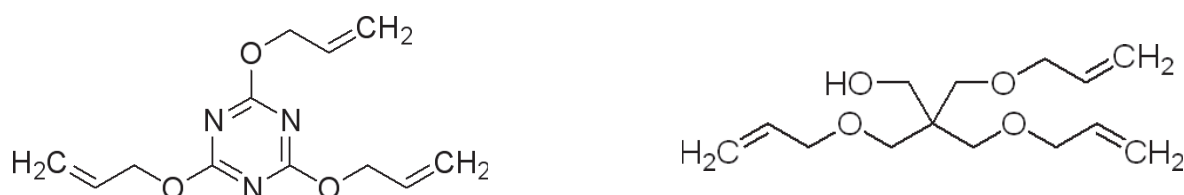


Figure I-31 : Structure des agents de réticulation TT (à gauche) et PETAE (à droite)

Ces structures réticulées (*Figure I-32*) présentent bien des propriétés élastiques améliorées (valeurs de ε_y jusqu'à 30 %) mais encore une fois une faible résistance mécanique (valeurs de E comprises entre 2 et 5 MPa). Les limitations de telles stratégies viennent du fait que la réticulation repose entièrement sur les fonctions terminales des polymères. Or, plus la masse molaire initiale du polymère est élevée, plus la proportion de fonctions réactives par masse de polymère sera faible. Autrement dit, la concentration en bouts de chaînes réactifs sera plus faible et, d'une part, la réaction de réticulation aura moins de chances de se réaliser et, d'autre part, même si elle intervient, la densité de réticulation restera limitée.

A cause de l'encombrement stérique et de la moindre accessibilité des sites actifs, l'utilisation de polymères de hautes masses molaires entraîne donc une diminution de la cinétique de réticulation voire une absence de réticulation. Ce phénomène limite par conséquent l'application de ce type de réticulation chimique à des polymères relativement courts (typiquement de masse molaire inférieure à 10 000 g/mol), ce qui diminue considérablement les propriétés mécaniques que l'on peut espérer atteindre. La réticulation directe le long des chaînes macromoléculaires et non sur les fonctions terminales permet de s'affranchir de cette restriction sur les masses molaires mais est beaucoup plus difficile à réaliser (conditions particulières, vide poussé ou CO_2 supercritique par exemple) et nécessitera par exemple de générer des radicaux par irradiation UV ou γ [254-257].

Les élastomères dégradables et notamment ceux synthétisés à partir des polyesters aliphatiques déjà très populaires en ingénierie tissulaire constituent donc une approche intéressante pour l'amélioration des propriétés mécaniques des polymères. La variété des structures pouvant être développées offre un large choix dans les propriétés recherchées, qu'il s'agisse des propriétés mécaniques ou de la cinétique de dégradation. Le choix de la voie de réticulation a un impact direct sur la mise en forme du matériau. La plupart des TPE, comme les thermoplastiques, sont à la fois fusibles et solubles dans certains solvants. L'avantage que constitue la facilité de mise en œuvre est donc préservé. Les chaînes macromoléculaires des élastomères thermodurcissables sont liées entre elles de manière covalente, ce qui rend ces polymères infusibles et insolubles. La mise en œuvre doit donc généralement être réalisée avant la réticulation du polymère. Ces élastomères sont cependant généralement plus souples que les TPE [219]. En conclusion, bien que peu étudiés à l'heure actuelle, les élastomères dégradables représentent une perspective intéressante pour le développement de matrices aux propriétés élastiques pour l'ingénierie tissulaire du ligament.

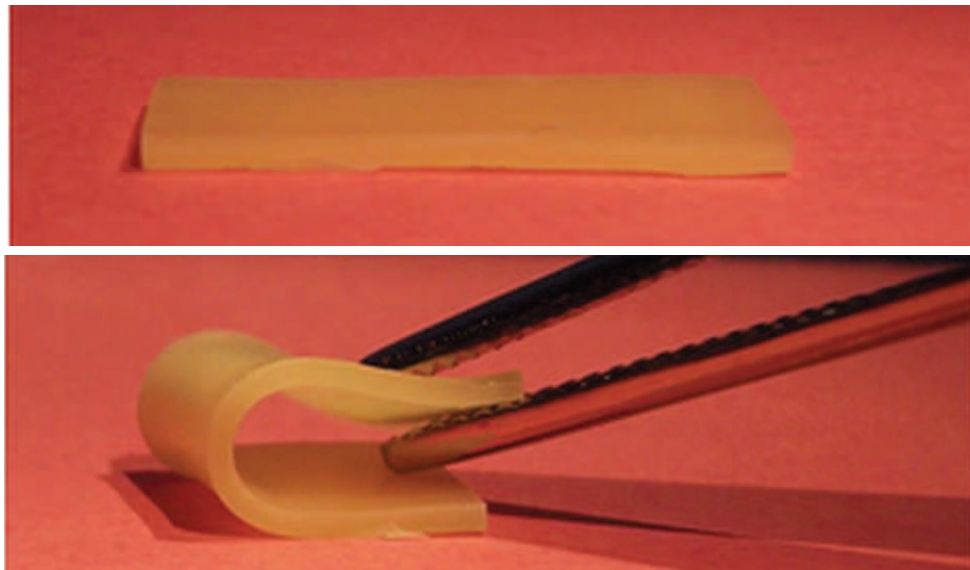


Figure I-32 : Elastomères obtenus par réticulation de PLA-PEG-PLA

5. Bilan et cadre de la thèse

Nous avons pu constater que malgré les progrès scientifiques réalisés à la fois dans la connaissance de la structure et de la constitution des ligaments ainsi que dans leur réparation chirurgicale, les blessures des ligaments et tendons et plus particulièrement la rupture du LCA restent un problème de santé publique non négligeable en France comme dans tous les pays développés. Bien que la technique d'autogreffe soit aujourd'hui maîtrisée et fournisse de bons résultats, la solution idéale n'a pas encore été mise au point.

L'ingénierie tissulaire est un domaine en plein essor qui connaît un engouement grandissant. Cette technique de régénération des tissus semble être une alternative prometteuse aux techniques chirurgicales actuelles et est aujourd'hui largement étudiée pour la réparation du LCA.

Dans le cadre du projet présenté dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à ce procédé. Contrairement à de nombreuses équipes travaillant sur ce sujet et qui utilisent en réalité des fils de sutures pour développer leurs matrices de régénération (notamment avec le PLA, le PLGA ou la soie), nous avons décidé d'accorder une attention particulière à la synthèse de nouveaux biomatériaux pour la constitution de la matrice. Trois stratégies différentes ont pour cela été envisagées.

La première d'entre elles se rapproche des solutions traditionnelles déjà développées par d'autres laboratoires. Ces premiers matériaux sont en effet des copolymères triblocs à base de PLA, sélectionné pour sa biocompatibilité reconnue et sa cinétique de dégradation relativement lente (de l'ordre de l'année), le temps de cicatrisation lors d'une réparation du LCA par autogreffe étant à l'heure actuelle de 6 à 12 mois environ. L'originalité de notre approche réside dans la copolymérisation du PLA avec deux polymères commerciaux qui ont été employés comme amorceurs de la polymérisation : le poloxamère et la poloxamine et plus précisément le Pluronic F-127 et le Tetronic 1107 (**Figure I-33**). Ces deux macroamorceurs sont eux-mêmes des copolymères de poly(éthylène glycol) et de poly(propylène glycol) (PEG et PPG). Ces polymères sont également biocompatibles et excrétables par l'organisme (le Pluronic est d'ores et déjà approuvé par la FDA).

Les intérêts de cette association sont multiples. On espère tout d'abord obtenir des copolymères relativement longs de manière à ce que se forment des enchevêtrements de chaînes (en particulier avec la poloxamine qui est un polymère en étoile) et un effet de **réticulation physique** grâce aux segments rigides (le PLA) et flexibles (macroamorceurs), ce qui aboutirait à des propriétés élastiques. Le choix du ratio PLA / macroamorceur permet par ailleurs de moduler les propriétés finales du copolymère puisque poloxamère et poloxamine sont des composés plutôt hydrophiles en raison de la présence des blocs PEG. Leur introduction dans le PLA est alors supposée à la fois accélérer légèrement sa dégradation et modérer son comportement fragile notamment en diminuant sa rigidité. Ce travail sur la balance hydrophile – hydrophobe du copolymère aura également des conséquences sur la réaction cellulaire, la forte hydrophobie du PLA étant parfois désignée comme responsable d'une inhibition de l'adhésion des cellules et de leur prolifération.

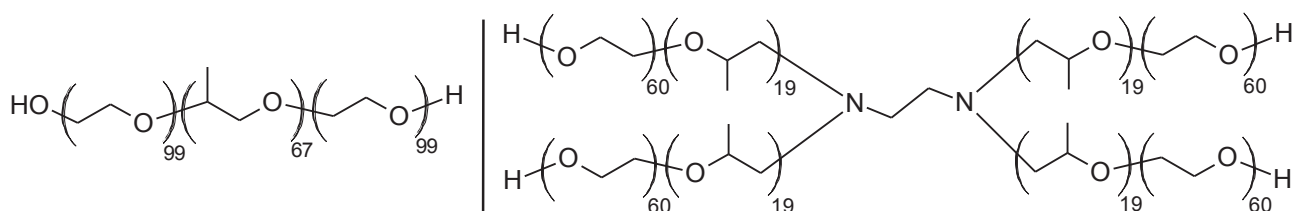


Figure I-33 : Structures du Pluronic F-127 et du Tetronic 1107

L'étude des polymères thermoplastiques ainsi développés repose notamment sur un test de dégradation *in vitro* réalisé afin d'évaluer l'évolution de leurs propriétés dans des conditions proches de celles d'un environnement physiologique. Cette étude a permis de réduire le nombre de formulations envisageables pour notre application ligamentaire

La deuxième stratégie, bien que très différente de la précédente, repose sur la synthèse d'une structure chimique très similaire. Alors que les copolymères triblocs décrits précédemment sont des polymères thermoplastiques, nous avons en effet cherché à préparer des élastomères thermodurcissables **réticulés chimiquement** à partir de PLA ainsi que du poloxamère ou de la poloxamine. Nous avons choisi de réaliser une photoréticulation activée par irradiation UV grâce à des agents réticulants porteurs de plusieurs groupements azoture qui ont la particularité d'être photoréactifs. L'irradiation doit normalement générer des radicaux nitrènes et permettre leur insertion directe dans les liaisons C-H des chaînes macromoléculaires de PLA et ainsi s'affranchir des difficultés évoquées plus tôt (cf. § I.4.2). Dans la suite de ce mémoire, nous nous référerons à cette stratégie sous l'appellation de "réticulation par voie nitrène".

La troisième et dernière stratégie repose également sur la synthèse d'une structure **réticulée chimiquement** mais à partir d'un autre polymère : la PCL. Une méthode de modification chimique a été appliquée à ce polyester afin de lui greffer des fonctions photosensibles. C'est à nouveau par irradiation UV que la photoréticulation a été activée mais le procédé repose sur une réaction de type thiol-yne. Dans la suite de ce mémoire, nous nous référerons à cette stratégie comme la "réticulation par voie thiol-yne".

A l'issue du développement et de l'évaluation de ces trois stratégies, nous avons sélectionné l'une d'entre elles pour une étude plus approfondie : la synthèse de polymères thermoplastiques. Un prototype de structure textile a en effet été développé à partir de ces polymères et d'un procédé inspiré de la littérature combinant tressage et torsadage. Ces matrices textiles ont alors étéensemencées avec des CSM et étudiées selon plusieurs critères afin d'évaluer leur potentiel comme supports de régénération ligamentaire, notamment la biocompatibilité et l'induction de différenciation ligamentocytaire après stimulation mécanique.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

1. Thermoplastiques

1.1. Synthèse des copolymères de PLA

Différents copolymères à blocs linéaires PLA-Pluronic et en étoile PLA-Tetronic ont été synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle (POC) de L-lactide (L-LA) et de D,L-lactide (D,L-LA).

Pour cela, les proportions de L-LA et de D,L-LA sont déterminées en fonction de la cristallinité souhaitée. Cette polymérisation est catalysée par l'octanoate d'étain (0,1 % molaire par rapport aux unités lactides) et amorcée par les hydroxyles terminaux du Pluronic ou du Tetronic (noms commerciaux de poloxamère et de poloxamine) qui sont eux-mêmes des copolymères de PEG et de PPG. Les macroamorceurs utilisés sont le Pluronic F127 (polymère linéaire de 12 600 g/mol) et le Tetronic 1107 (copolymère en étoile à quatre branches de 15 000 g/mol). Les proportions d'amorceur et de lactide sont déterminées en fonction de la masse molaire finale souhaitée.

Pour cette synthèse, les lactides et les macroamorceurs préalablement séchés sous vide et pesés sont placés dans un ballon à col long puis le catalyseur (en solution dans du THF à 350 mg/mL) est ajouté. Le ballon est ensuite relié à un robinet trois voies permettant de le mettre successivement sous vide et sous arrivée d'argon. Quinze cycles argon/vide sont ainsi réalisés à température ambiante afin d'éliminer toute trace de dioxygène (inhibiteur de la polymérisation) et d'eau (pouvant générer des réactions secondaires) du milieu réactionnel. Le ballon est ensuite scellé sous vide dynamique (environ $10 \cdot 10^{-3}$ mbar) et placé dans une étuve à polymérisation rotative à 110°C pendant 5 à 7 jours. Le ballon est ensuite ouvert, le polymère formé récupéré par dissolution dans du dichlorométhane (DCM). La solution obtenue est concentrée à l'évaporateur rotatif et le polymère est reprecipité dans de l'éther diéthylique froid. Le polymère est finalement séché sous vide et pesé. Le rendement final obtenu est d'environ 86 %.

RMN ^1H : (300 MHz; CDCl_3) : δ (ppm) = 5,1 (1H, CO-CH(CH₃)-O), 3,6 (4H, CH₂-CH₂-O), 3,5 (2H, CH(CH₃)-CH₂-O), 3,4 (1H, CH(CH₃)-CH₂-O), 1,5 (3H, CO-CH(CH₃)-O), 1,1 (3H, CH(CH₃)-CH₂-O).

Les degrés de polymérisation (\overline{Xn}) et masses molaires des copolymères ainsi synthétisés ont pu être déterminés non seulement par chromatographie d'exclusion stérique (cf. § II.4.1) mais aussi par analyse RMN grâce à l'intégration des différents signaux présents sur les spectres et à l'utilisation des formules suivantes :

$$\overline{Xn}_{(PLA)} = \overline{Xn}_{(PEG)} / (EG/LA)$$

$$\overline{Mn} = n \times (\overline{Xn}_{(PLA)} \times 72) + \overline{Mn}_{\text{amorceur}}$$

où EG/LA est le ratio des motifs éthylène glycol et acide lactique calculé à partir de l'intégration des pics à 3,6 et 1,5 ppm des spectres RMN ; dans le cas du Pluronic, $\overline{Mn}_{\text{amorceur}} = 12,6$ kg/mol, $\overline{Xn}_{(PEG)} = 99$ et $n = 2$ tandis que dans le cas du Tetronic, $\overline{Mn}_{\text{amorceur}} = 15$ kg/mol, $\overline{Xn}_{(PEG)} = 60$ et $n = 4$.

Ces copolymères à blocs ont été nommés d'après la nomenclature suivante (nomenclature IUPAC) : un nombre représentant le pourcentage d'unités L-LA dans le PLA constituant le copolymère, une lettre représentant le bloc central (P pour le Pluronic ou poloxamère et T pour Tetronic ou poloxamine) et enfin un nombre représentant la masse molaire théorique du copolymère (en kg/mol). Le 94P100 est par exemple un copolymère de masse molaire théorique de 100 kg/mol constitué de PLA₉₄ et de Pluronic. De la même manière, la notation P100 désignera par exemple une série de polymères de 100 kg/mol constitués de Pluronic, toutes cristallinités de PLA confondues.

Copolymère	Composition massique (%)		
	L-LA	D,L-LA	Amorceur
50P100	0,0	87,4	12,6
70P100	35,0	52,4	12,6
94P100	76,9	10,5	12,6
50T120	0,0	87,5	12,5
70T120	35,0	52,5	12,5
94T120	77,0	10,5	12,5

Tableau II-1 : Composition des copolymères utilisés lors de l'étude préliminaire

Copolymère	Composition massique (%)		
	L-LA	D,L-LA	Amorceur
94P100	76,9	10,5	12,6
96P100	80,4	7,0	12,6
94T100	74,8	10,2	15,0
94P200	82,5	11,2	6,3
96P200	86,2	7,5	6,3
94T200	81,4	11,1	7,5

Tableau II-2 : Composition des copolymères utilisés lors des tests de dégradation

1.2. Mise en œuvre des polymères

Plusieurs mises en forme des copolymères ont été employées au cours de cette étude selon l'utilisation désirée.

➤ Les films de copolymères ont tout d'abord été préparés par évaporation de solvant. Pour cela, ils sont dissous dans du DCM (1 g de polymère pour 10 mL de solvant) puis les solutions obtenues sont disposées dans des cristallisoirs ou des moules métalliques (acier ou aluminium) à fond plat et recouverts d'entonnoirs afin de ralentir l'évaporation du solvant et ainsi éviter l'apparition de bulles dans le matériau. Après une nuit d'évaporation, les films obtenus sont décollés et séchés sous vide.

➤ La seconde technique utilisée pour obtenir des films de polymères a été le moulage à chaud. Pour cela, 3 g de polymère sont découpés finement et placés dans un moule en acier inoxydable. Le tout est tout d'abord placé dans une étuve à 200°C puis, après fusion du polymère, mis sous une pression de 8 tonnes grâce à une presse Carver 4120 dont la température du plateau inférieur est réglée à 200°C. Après 10 minutes, la pression est maintenue mais le chauffage est stoppé et le moule plongé dans un mélange d'eau et de glace pendant 10 minutes. Le film obtenu est finalement décollé et séché sous vide.

➤ La dernière technique de mise en forme a été employée afin d'obtenir des microfibrilles de polymère destinées à une mise en forme finale textile. La mise en forme a été effectuée sur un appareillage DSM Xplore de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille aimablement mis à disposition par le Pr Sophie Duquesne de l'Unité Matériaux et Transformations (UMR CNRS 8207) de l'Université Lille 1. Le système est constitué d'une micro-extrudeuse bi-vis couplée à une micro-fileuse. Pour réaliser cette mise en œuvre, une filière d'extrusion de diamètre choisi est montée sur la micro-extrudeuse, 20 g de polymère préalablement broyés sont incorporés dans la chambre d'extrusion à 200°C et les vis mises en rotation à 80 rpm. Lorsque le couple mesuré devient nul (indiquant la fusion totale du polymère), la vitesse de rotation est abaissée à 15 rpm et la filière d'extrusion ouverte. Le jonc de polymère est récupéré, enroulé une fois autour du rouleau d'étirage de la micro-fileuse puis accroché sur le rouleau de récupération réglé à une vitesse d'enroulement de 30 m/min. L'ensemble est laissé en fonctionnement extrusion-filage jusqu'à ce que le volume de polymère soit insuffisant pour alimenter l'extrusion.

A partir des microfibrilles obtenues grâce au procédé d'extrusion-filage, une technique de mise en forme textile a été appliquée afin d'obtenir des prototypes de matrices de régénération tissulaire. Cette méthode repose sur l'association du torsadage et du tressage des fibres ayant notamment pour but l'amélioration des propriétés mécaniques. Dans un premier temps, 10 microfibrilles d'environ 75 cm de long sont découpées et attachées ensemble à leur extrémité à la tête rotative d'un appareil de torsadage. La tête est alors mise en rotation pendant 10 secondes afin d'obtenir un brin de 10 fibres torsadées ensemble. Au total, 3 brins sont ainsi préparés et finalement tressés ensemble manuellement pour obtenir un support de régénération (les termes de "tresse" ou de "matrice" seront également employés dans ce rapport pour désigner ces supports).

1.3. Etude de dégradation

Une étude de dégradation *in vitro* à court terme a été menée sur 7 semaines afin d'identifier, parmi les copolymères sélectionnés, ceux qui auraient le meilleur comportement après cette dégradation. Une attention particulière a été portée sur l'évolution de leur prise d'eau, leur perte de masse, leur masse molaire et leurs propriétés thermiques et mécaniques.

Pour cette étude, les polymères ont été préparés sous forme de films d'environ 0,5 mm d'épaisseur par moulage à chaud. Des bandelettes de 30 x 10 mm (n = 3) ont été découpées,

pesées (masse initiale M_i), plongées dans 8 mL de PBS (pH 7,4) et maintenues à 37°C sous agitation dans un incubateur Heidolph Inkubator 1000 équipé d'un plateau agitant Heidolph Unimax 1010. Le pH du milieu était contrôlé régulièrement et le PBS renouvelé en cas de variation supérieure à 0,4 unité de pH. A des temps d'analyse prédéterminés (2, 4 et 7 semaines), les bandelettes ont été ôtées du PBS, pesées (masse hydratée M_h) et analysées en traction mécanique (voir paragraphe II.4.6.). Après rupture, les échantillons ont été récupérés, séchés sous vide, pesés (masse sèche M_s) et analysés par GPC et DSC. Les prises d'eau et pertes de masse de ces échantillons ont finalement été calculés grâce aux équations suivantes.

$$\text{Prise d'eau (\%)} = 100 \times (M_h - M_s) / M_s$$

$$\text{Perte de masse (\%)} = 100 \times (M_i - M_s) / M_i$$

Les échantillons correspondant au temps 0 ont en réalité été maintenus une nuit sous les conditions de dégradation afin d'être à l'état hydraté lors de l'essai de traction mécanique.

2. Elastomères réticulés

2.1. Réticulation par voie nitrène

2.1.1. Synthèse des polymères

Le procédé de réticulation par voie nitrène a été testé sur plusieurs polymères dégradables : la PCL et le PLA. La PCL utilisée est un polymère commercial ($\overline{Mn} \approx 32\ 000$ g/mol, Sigma-Aldrich) tandis que le PLA a été synthétisé selon un protocole similaire aux copolymères décrits précédemment (cf. § II.1.1) en employant l'alcool benzylque comme amorceur de polymérisation à la place du Pluronic et du Tetronic. De la même manière, des quantités de lactides et d'amorceur sont introduits en quantités déterminées en fonction de la masse molaire et de la cristallinité souhaitées dans un ballon à col long. Après ajout de l'octanoate d'étain comme catalyseur, le ballon est scellé et placé en étuve à polymérisation à 110°C pendant 5 à 7 jours. A l'issue de la réaction, le polymère est récupéré par dissolution dans du DCM et précipité dans de l'éther diéthylique froid avant d'être séché.

2.1.2. Agents de réticulation azidés

Les composés azidés étant des espèces photoréactives, ils ont été manipulés autant que possible dans l'obscurité et protégés de la lumière par des feuilles d'aluminium dans les différents montages où ils ont été utilisés et mentionnés dans ce rapport.

Différents polyazotures (ou composés polyazidés) ont été employés comme agent de réticulation de polymères. Le premier est un composé commercial, la 2,6-bis(4-azidobenzylidène)-4-méthylcyclohexanone (370,42 g/mol, TCI Europe), doté de deux fonctions azotures terminales (**Figure II-1**). Ce produit sera désigné par l'abréviation BA dans ce rapport.

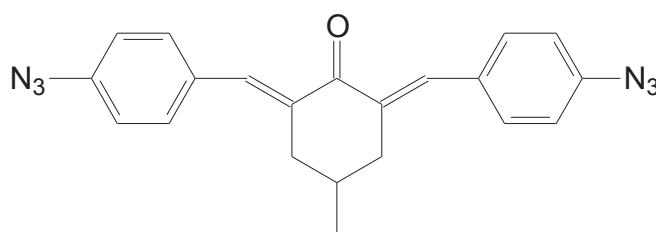


Figure II-1 : 2,6-bis(4-azidobenzylidène)-4-méthylcyclohexanone

D'autres agents de réticulation ont été synthétisés par réaction d'estérification entre l'acide azidobenzoïque (**Figure II-2**) et différents composés dotés de plusieurs groupements hydroxyles afin d'obtenir des agents de réticulation de diverses longueurs et fonctionnalités. Le Pluronic F127 et le Tetronic 1107 ont notamment été employés dans ce sens. Ces synthèses ont été réalisées grâce à deux méthodes différentes.

La première repose sur un mécanisme d'estérification de Fischer-Speier catalysée par l'acide paratoluènesulfonique (APTS). Pour cette synthèse, le polyol et l'acide azidobenzoïque (1,2 équivalents par fonction alcool) sont tout d'abord introduits dans un ballon bicol et dissous dans du DCM. L'APTS est ensuite ajouté en quantité catalytique et du tamis moléculaire placé dans le milieu réactionnel afin de piéger l'eau produite par l'estérification. Le mélange est alors laissé sous agitation à l'abri de la lumière et chauffé à reflux à 60 °C pendant au moins 72 heures. Après réaction le tamis moléculaire est tout d'abord éliminé par décantation et centrifugation. Ensuite, la phase organique contenant le DCM et l'ester est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (3 x 100 mL) et à l'eau distillée (3 x 100 mL) puis séchée au sulfate de magnésium, filtrée sur fritté et concentrée à l'évaporateur rotatif.

La seconde méthode est une estérification de Steglich, reposant sur l'utilisation du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (*Figure II-2*). Le DCC est un agent de couplage qui permet la formation d'une O-acylisourée dont la réactivité est proche de celle de l'anhydride correspondant à l'acide carboxylique utilisé. Le DMAP catalyse la réaction entre l'alcool et l'acide carboxylique ainsi activé et conduit à la formation de l'ester et de la dicyclohexylurée (DCU) (*Figure II-3*).

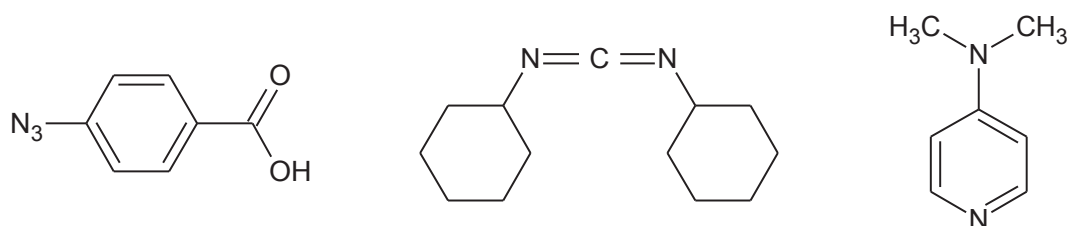


Figure II-2 : Acide azidobenzoïque (à gauche), DCC (au milieu) et DMAP (à droite)

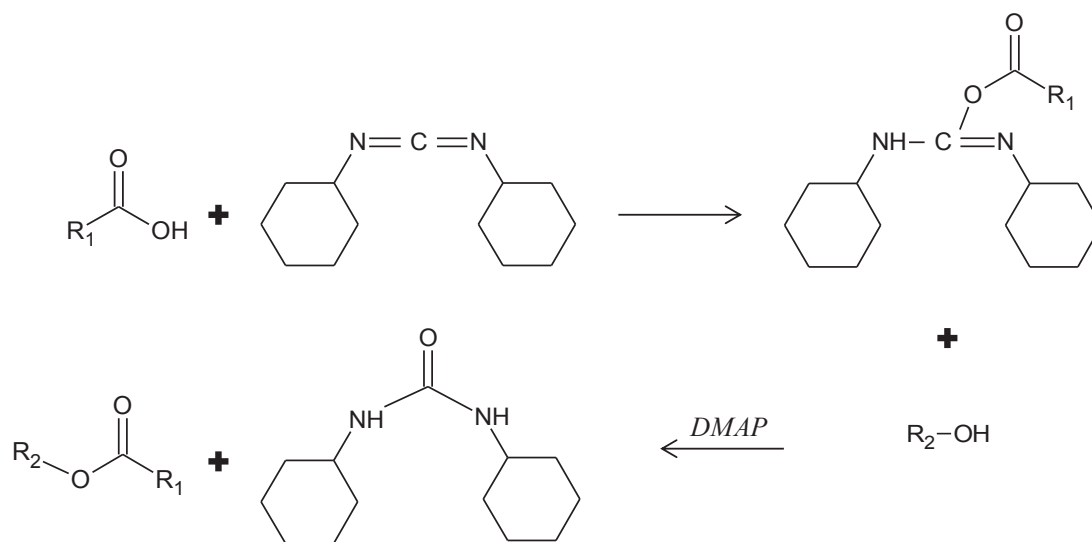


Figure II-3 : Schéma réactionnel de l'estérification de Steglich

Avant la synthèse de l'ester, le DCC est tout d'abord purifié par dissolution dans du DCM sec, ajout de sulfate de magnésium et agitation pendant 6 heures. Le MgSO₄ et la DCU éventuellement présente (insoluble dans le DCM) sont ensuite éliminés par filtration sur fritté. La DMAP est quant à elle purifiée par recristallisation dans du toluène.

Pour effectuer l'estérification, le polyol et l'acide azidobenzoïque (1,2 équivalents par fonction alcool) sont introduits dans un ballon monocol et dissous dans du DCM. Le DCC

(1,2 équivalents par fonction alcool) et la DMAP (0,6 équivalent par fonction alcool), préalablement dissous dans du DCM sont ensuite ajoutés. Le montage est protégé de la lumière et maintenu sous agitation pendant 72 heures à température ambiante. Après réaction, le milieu est filtré sur fritté et concentré à l'évaporateur rotatif pour éliminer le DCM. Le produit est ensuite à nouveau dissous dans du THF et dialysé à l'aide d'une membrane de seuil de coupure de 3500 Da. Après 48 heures de dialyse le contenu de la dialyse est récupéré et concentré à l'évaporateur rotatif puis séché à l'étuve sous vide.

RMN ¹H Pluronic et Tetronic azidés : (300 MHz; CDCl₃) : δ (ppm) = 8,1 (2H aromatiques, CH=CH-C-N₃), 7,1 (2H aromatiques, CH=CH-C-N₃), 4,4 (2H, CH₂-CH₂-O ester), 3,9 (1H, N-CH₂-CH), 3,8 (2H, CH₂-CH₂-O ester), 3,6 (4H, CH₂-CH₂-O éther), 3,5 (2H, CH(CH₃)-CH₂-O), 3,4 (1H, CH(CH₃)-CH₂-O), 1,1 (3H, CH(CH₃)-CH₂-O).

Les taux de substitution obtenus avec l'acide azidobenzoïque ont été déterminés grâce au calcul du rapport des intégrations des pics caractéristiques des protons aromatiques de l'acide azidobenzoïque (pics à 8,1 et 7,1 ppm) et des protons méthyléniques des motifs éthylène glycol (pic à 3,6 ppm).

2.1.3. Procédé de réticulation

Le procédé de réticulation par voie nitrène a tout d'abord consisté à préparer des films contenant un polymère et un réticulant. Pour cela, des quantités choisies de polymère (également appelé la matrice) et de composé polyazidé (l'agent de réticulation) sont dissoutes dans du DCM. Après dissolution complète des produits et homogénéisation de la solution par agitation, celle-ci est utilisée pour obtenir un film par évaporation grâce à la méthode décrite précédemment (cf. § II.1.2). Elle est versée dans un moule en acier ou un cristalliseur et laissée à évaporer pendant une nuit à l'abri de la lumière, le film formé est ensuite décollé et séché sous vide. La seconde étape de ce procédé consiste en l'irradiation du film (10 secondes par face) au moyen d'une lampe de projection UV Dymax PC-2000 d'une intensité de 75 mW/cm² (315-395 nm).

A titre d'expérience contrôle, des films ont également été préparés à partir de PLA et de Pluronic ou Tetronic non modifiés et irradiés par UV avant d'être analysés.

2.2. Réticulation par voie thiol-yne

2.2.1. Propargylation de la PCL

La propargylation de la PCL a été réalisée par activation anionique du polymère suivie de l'ajout de l'électrophile, le bromure de propargyle.

Toute la verrerie utilisée au cours de cette synthèse de PCL propargylée l'a été après séchage dans une étuve à 100°C. La synthèse est réalisée dans un réacteur conique quadricol de 500 mL. En fonction des conditions retenues, 3 à 8 g de PCL et 300 à 400 mL de THF anhydre y sont introduits et mis sous flux d'argon et agitation mécanique à l'aide d'une pale en téflon (**Figure II-4**). Après dissolution complète de la PCL, le milieu est refroidi à -50°C grâce à un bain éthanol-azote liquide. Le diisopropylamidure de lithium (LDA) est ajouté à la seringue (0,5 équivalent par motif monomère) à travers un septum et le milieu est maintenu à -50°C sous agitation pendant 30 minutes pour générer un macropolycarbanion de PCL. Le réactif substituant, le bromure de propargyle est ensuite ajouté à la seringue (0,5 équivalent par motif monomère) et la réaction est maintenue pendant 30 minutes sous agitation tout en laissant la température du bain d'éthanol-azote remonter progressivement jusqu'à -30°C.

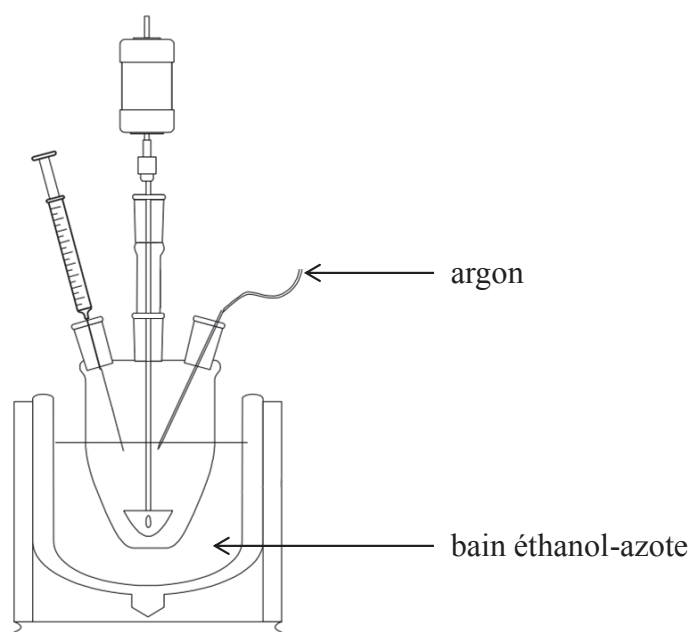


Figure II-4 : Montage de la réaction de propargylation de la PCL

Le réacteur est alors ôté du bain éthanol-azote et la réaction est stoppée par ajout de 100 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium et par ajustement du pH à 7 à l'aide d'acide chlorhydrique. Le copolymère PCL-co-PCL propargylée formé est ensuite extrait au

DCM (3 x 150 mL). La fraction organique obtenue est lavée à l'eau distillée (3 x 150 mL), séchée au sulfate de magnésium, filtrée sur fritté et concentrée à l'évaporateur rotatif. L'huile obtenue est précipitée dans du méthanol froid sous agitation magnétique. Le polymère est récupéré par filtration sur fritté et séché à l'étuve sous vide.

Une seconde technique a été évaluée pour la synthèse de la PCL propargylée. Au cours de cette méthode, la réaction est effectuée dans un réacteur double-enveloppe refroidi grâce à un cryostat à circulation d'éthanol à - 40°C. Le reste du protocole est identique au précédent.

RMN ¹H : (300 MHz; CDCl₃) : δ (ppm) = 4,0 (2H, CH₂-O), 3,4 (2H, CH₂-OH), 2,4-2,6 (1H, C(O)CH(CH₂-C≡CH) et 2H, CH₂-C≡CH), 2,3 (2H, C(O)CH₂), 2,0 (1H, C≡CH), 1,6 (4H, C(O)CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O), 1,4 (2H, C(O)CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O).

Les taux de substitution traduisant l'efficacité de la réaction de greffage ont été déterminés grâce aux intégrations de pics obtenus par RMN et au calcul du ratio de motifs propargylés (pic du proton terminal de l'alcyne à 2,0 ppm) et de motifs non propargylés (pic des protons situés en α de l'ester sur le squelette de la PCL à 4,0 ppm).

2.2.2. Procédé de réticulation

Pour réticuler la PCL propargylée, des films ont tout d'abord été préparés par évaporation de solvant. Pour cela, de la PCL propargylée seule ou des mélanges de PCL et de PCL propargylée (pour une masse totale de polymère de 1,2 g) sont dissouts dans 10 mL de DCM. A certains mélanges est ajouté un photoamorceur en solution dans du DCM (6 mg/mL), la 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (Irgacure[®] 651) ou la 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyéthoxy)-2-méthylpropiophénone (Irgacure[®] 2959) à hauteur de 0,5 %_{wt} par rapport à la masse de polymère soit 6 mg (environ 0,2 % molaire par rapport aux motifs PCL). L'agent de réticulation, le pentaérythritol tetrakis-(3 mercaptopropionate) (PETMP) est finalement ajouté (0,25 équivalent par fonction alcyne) après homogénéisation de la solution. Celle-ci est ensuite versée dans un moule en aluminium et laissée à évaporer pendant une nuit. Le film obtenu est décollé et séché sous vide avant d'être irradié (10 minutes par face) avec la lampe UV Dymax PC-2000 afin de provoquer la réticulation.

2.3. Evaluation de la réticulation

L'une des caractéristiques d'un polymère suffisamment réticulé est son insolubilité. Cette particularité a donc été utilisée pour évaluer la réticulation des polymères étudiés. Dans notre étude, qu'il s'agisse des produits développés par voie nitrène ou par voie thiol-yne, les polymères qui ont été irradiés et que l'on suppose réticulés sont tout d'abord pesés (masse initiale M_i) puis plongés dans 15 mL de DCM pendant 48 heures sous légère agitation. Les parties insolubles (donc réticulées) mais toujours gonflées par le solvant des échantillons sont alors ôtées du solvant et immédiatement pesées (masse gonflée M_g). Enfin, ces échantillons sont séchés sous vide pendant 24 heures et pesés une dernière fois (masse réticulée M_r). Ces valeurs nous permettent de calculer la fraction de gel et le gonflement de chaque échantillon grâce aux équations suivantes.

$$\text{Fraction de gel (\%)} = 100 \times (M_r / M_i)$$

$$\text{Gonflement (\%)} = 100 \times (M_g / M_r)$$

La réticulation des échantillons a également été étudiée via leurs propriétés thermiques, en particulier par DSC et TGA (voir paragraphe II.4.2).

3. Biologie cellulaire

3.1. Culture cellulaire

Tous les produits utilisés en culture cellulaire évoqués dans ce paragraphe sont des produits Gibco-Invitrogen obtenus auprès de Fisher Scientific ou Lonza obtenus auprès de Ozyme.

➤ Milieu de culture

Les cultures cellulaires ont été faites en utilisant du milieu de culture complet constitué des éléments suivants :

- milieu de culture DMEM
- 10 % de sérum de veau fœtal (SVF)
- Pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL) (Pen Strep)
- Glutamine 2 mM.

➤ Cellules et conditions de culture

Les cellules utilisées au cours de ce projet ont été cultivées dans du milieu de culture complet décrit précédemment renouvelé tous les 2 à 3 jours et dans un incubateur à atmosphère humide à 5 % de CO₂ et à 37°C. Les rinçages des cellules ont été effectués avec du DPBS stérile et les décollements par incubation de 5 minutes dans une solution de Trypsine-EDTA (0,05 %).

Trois types de cellules ont été étudiés au cours de ces travaux. La lignée de CSM murines C3H10T1/2 (désignée ci-après cellules C3) et sa dérivée clonale C9 (cellules exprimant la protéine morphogénétique osseuse BMP-2) sont issues de cellules embryonnaires de souris C3H10T1/2. Lors de leur maintien et de leurs passages, les cellules C9 ont été cultivées en présence de doxycycline (1 µg/mL) afin de réprimer l'expression de BMP-2. Les cellules primaires Black 6 (B6) ont été isolées à partir de moelle osseuse de souris C57/B16.

➤ Désinfection

Tous les échantillons de polymères qui ont été utilisés en culture cellulaire (en particulier dans le cadre des tests de cytocompatibilité) ont préalablement été désinfectés suivant le même protocole :

- immersion de 30 minutes dans de l'éthanol à 70 %
- rinçage au DPBS stérile
- immersion de 48 heures à 37°C dans une solution de DPBS stérile à 10 % de Pen Strep
- trois rinçages (2 x 5 minutes et 1 x 12 heures) au DPBS stérile.

3.2. Cytocompatibilité

Deux types d'expériences ont été pratiquées afin d'évaluer la cytocompatibilité des polymères avec les CSM : un test de prolifération cellulaire reposant sur l'utilisation du *PrestoBlue*®, et un test de viabilité par visualisation des cellules après marquage fluorescent.

➤ **Conditions de culture**

Les cellules sontensemencées d'une part dans des puits de boîtes de culture en polystyrène traité pour la culture cellulaire (TCPS) qui constitueront le témoin positif et d'autre part sur le matériau étudié placé dans un puits TCPS. Dans ce cas, le matériau consiste en des pastilles de diamètre identique au diamètre du puits de culture qui sont maintenues par des O-rings. Les O-rings sont des joints toriques constitués de Viton (DuPont), un fluoroélastomère qui ne présente pas de cytotoxicité. Cet accessoire permet de maintenir l'échantillon en forme de disque au fond du puits de culture tout en assurant une étanchéité, évitant ainsi la prolifération de cellules sur le TCPS sous l'échantillon. Les cellules sont incubées dans le milieu de culture complet avec renouvellement tous les 2 ou 3 jours.

Dans le cas des tresses, l'impossibilité de recourir aux O-rings a été palliée par l'utilisation de boîtes de culture ULA (Costar, Fisher Scientific) en polystyrène traité pour empêcher l'adhésion cellulaire, empêchant ainsi les cellules d'adhérer au fond de la boîte de culture. De plus, pour favoriser l'attachement des cellules à ces tresses, les échantillons sont placés en agitation pendant 5 heures sur agitateur orbital Labnet Gyrotwister avant d'être placés en incubateur.

➤ **Test de prolifération *PrestoBlue***

Aux temps déterminés, les puits sont vidés de leur milieu de culture et rincés avec du DPBS stérile puis de la solution de *PrestoBlue* à 10 % est ajoutée. Après incubation à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂ pendant un temps compris entre 20 minutes et 2 heures, le milieu résultant est homogénéisé par agitation puis 200 µL de surnageant sont prélevés et placés dans une plaque 96 puits pour analyse sur lecteur de plaques. Les conditions du test ont varié en fonction du support étudié. Les différentes conditions utilisées pour ces tests de prolifération sont résumées dans le *Tableau II-3*.

Le *PrestoBlue* (Life Technologies, Molecular Probes) est une solution constituée de résazurine, un indicateur coloré (bleu et non fluorescent) perméable aux membranes cellulaires qui est réduit par l'activité métabolique des cellules en résorufine (rose et fluorescente). Cette réduction qui peut être mesurée par spectrométrie en absorbance ou en fluorescence est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et métaboliquement actives présentes dans le milieu. Elle dépend également du temps d'incubation du réactif avec les cellules et de la température d'incubation. L'un des principaux avantages de ce test réside

dans son caractère non destructif, contrairement à certains autres réactifs de ce type. Il permet ainsi d'effectuer l'analyse sur les mêmes cellules aux différents temps tout au long de l'expérience. Dans les tests décrits par la suite, le *PrestoBlue* est utilisé en solution à une concentration de 10 % dans du milieu de culture complet préparé avec du milieu de culture DMEM/F-12 exempt de rouge de phénol au lieu du milieu DMEM classique.

support	pastille (film moulé à chaud)	tresse
dimensions de l'échantillon	15 mm de diamètre	1 cm de long
volume de <i>PrestoBlue</i>	1 mL	5 mL
temps d'incubation	2 heures	30 minutes
lecteur de plaques	Multiskan FC	Varioskan Flash
mode de lecture	absorbance 570 / 595 nm	fluorescence 560 / 590 nm
autres	utilisation de O-rings	test sur ULA

Tableau II-3 : Conditions des tests de prolifération PrestoBlue

➤ **Test de viabilité *Live/Dead***

La viabilité des cellules sur les copolymères a été étudiée visuellement grâce à des observations réalisées par microscopie confocale à fluorescence de cellules marquées au moyen d'un kit *Live/Dead* (Promokine). Ce kit contient deux marqueurs fluorescents : l'acétoxyméthyl-calcéine (calcéine-AM) à fluorescence verte (excitation à 490 nm et émission à 515 nm) qui pénètre dans la membrane des cellules vivantes et l'homodimère d'éthidium III (EthD-III) à fluorescence rouge (excitation à 490 nm et émission à 620 nm) qui ne peut pénétrer que dans les membranes cellulaires endommagées ou de cellules mortes et qui s'intercale avec l'ADN du noyau.

Pour effectuer ce marquage, une solution est tout d'abord préparée à partir des deux solutions mères de manière à obtenir une concentration finale de 2 μ M pour la calcéine-AM et 4 μ M pour l'EthD-III. Chaque échantillon est plongé dans 1,5 mL de cette solution pendant 30 minutes, rincé une fois avec du DPBS stérile, fixé dans 1 mL de paraformaldéhyde à 4 % et rincé une dernière fois dans du DPBS stérile. Les échantillons ainsi préparés sont finalement observés au moyen d'un microscope confocal à fluorescence (MCF) (cf. § II.4.3).

3.3. Tests de différenciation

➤ Différenciation par facteur de croissance

Pour le premier test de différenciation réalisé en monocouche, des CSM C3 et C9 sontensemencées (250 000 cellules par puits de culture 6 puits ou TC6) et incubées. Différents traitements leur sont alors appliqués (**Tableau II-4**). Le milieu *low serum* est un milieu complet mais constitué de seulement 1 % de SVF. Le traitement BMP-12 est réalisé en ajoutant la protéine murine recombinante BMP-12 au milieu de culture des cellules C3 à une concentration de 10 ng/mL. Le traitement BMP-2 consiste à enlever la doxycycline du milieu de culture de cellules C9 à une concentration de 1 µg/mL pour lever l'inhibition de l'expression BMP-2. Les cellules C9 sont en effet des cellules C3 génétiquement modifiées pour exprimer BMP-2 et cette expression peut être réprimée par ajout de doxycycline. Le traitement C3 BMP-2 correspond donc à la culture de cellules C9 en l'absence de doxycycline tandis que le traitement C3 BMP-2 24h consiste en l'ajout de doxycycline au milieu de culture après 24 heures. Après 21 jours de culture, les cellules sont décollées par trypsination pour analyse RT-qPCR.

Echantillon	Traitements	
	24 premières heures	ensuite
C3	milieu <i>low serum</i>	milieu complet
C3 BMP-2 24h	milieu <i>low serum</i> + BMP-2	milieu complet
C3 BMP-2	milieu <i>low serum</i> + BMP-2	milieu complet + BMP-2
C3 BMP-12 24 h	milieu <i>low serum</i> + BMP-12	milieu complet
C3 BMP-12	milieu <i>low serum</i> + BMP-12	milieu complet + BMP-12

Tableau II-4 : Traitements BMP appliqués aux CSM pour induire la différenciation

➤ **Différenciation avec acide ascorbique et β -glycérophosphate**

Pour le second test de différenciation en monocouche, les cellules C3 et B6 sont tout d'abordensemencées (72 000 cellules par puits de TC6) puis incubées dans le milieu complet. A confluence (J_4), une partie des cellules est laissée dans le milieu complet (témoin négatif) et l'autre partie est cultivée dans du milieu de différenciation consistant en milieu complet contenant de l'acide ascorbique (AA) à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et du β -glycérophosphate (β -GP) à 10 mM. A J_7 , J_{14} , J_{21} et J_{28} , des cellules sont décollées par trypsination pour analyse RT-qPCR.

➤ **Différenciation avec étude de l'influence de la densité d'ensemencement**

Un test similaire a été effectué uniquement sur les cellules C3ensemencées avec deux densités différentes : 16 000 et 80 000 cellules par puits de TC24. Dès l'ensemencement (J_0), les cellules sont cultivées dans du milieu de différenciation (milieu complet contenant de l'AA à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et du β -GP à 10 mM) et maintenues en incubation. A J_3 , J_7 , J_{10} , J_{14} , et J_{21} , des cellules sont décollées par trypsination pour analyse RT-qPCR

➤ **Différenciation en monocouche et sur matrices de régénération**

Les cellules C3 sontensemencées sur des matrices textiles d'environ 1,5 cm de long placées dans des puits ULA (16 000 et 80 000 cellules par échantillon dans des puits de TC24) puis incubées dans le milieu complet. A partir de la confluence (J_0) le milieu de prolifération est remplacé par du milieu de différenciation (milieu complet contenant de l'AA à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et du β -GP à 10 mM). Des cellules sont ensuite décollées à J_3 , J_7 , J_{14} et J_{21} pour analyse RT-qPCR.

➤ **Différenciation avec stimulation mécanique**

Pour la réalisation du test de différenciation avec stimulation mécanique, des boucles sont préparées à partir de portions de matrices textiles d'environ 5,5 cm de long. Pour maintenir les deux extrémités ensemble, celles-ci sont soudées en les immergeant très brièvement ensemble dans du DCM. Les boucles obtenues (*Figure II-5*) sont ensuite désinfectées etensemencées avec 56 000 cellules. Les échantillons sont incubés dans du milieu complet pendant 2 jours. A partir du 3^{ème} jour (désigné arbitrairement J_0), le milieu est remplacé par du milieu de différenciation (AA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et β -GP 10 mM) et soumis à des sollicitations mécaniques cycliques (5 % de déformation puis relaxation) à une fréquence de 0,5 Hz pendant une heure tous les 1 à 2 jours. Les cellules présentes sur les échantillons sont

décollées par trypsination à J₃ (3 séances de sollicitations mécaniques), J₇ (4 séances) et J₁₁ (7 séances) pour analyse RT-qPCR.

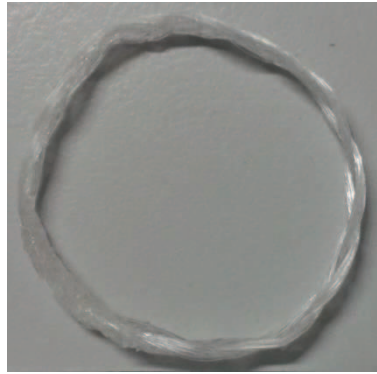


Figure II-5 : Boucle de matrice textile

La stimulation mécanique a été appliquée grâce à un appareillage mis au point par le Dr Benoît Charlot de l'Institut d'électronique du Sud (UMR CNRS 5214) à l'Université Montpellier 2. Ce système (*Figure II-6* et *Annexe 1*) est constitué d'un moteur piézoélectrique Nexact N-381.30 contrôlé via une interface Nexact E-861 par le logiciel PIMikroMove (Physik Instrumente). Il peut effectuer une course de 30 mm et développer une force maximale de 10 N à une fréquence comprise entre 0 et 800 Hz. Ce moteur a été monté sur une structure permettant d'accrocher et de stimuler les échantillons tout en les maintenant plongés dans du milieu de culture dans une boîte de culture.

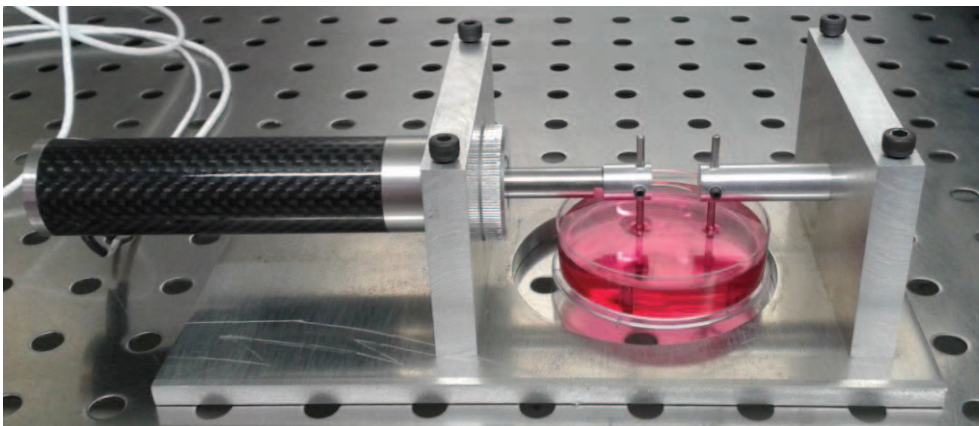


Figure II-6 : Dispositif de stimulation mécanique cyclique

4. Caractérisations et appareillages

4.1. Caractérisations chimiques

➤ Chromatographie d'exclusion stérique (GPC)

Les masses molaires et dispersités des polymères étudiés ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (GPC) dans le THF à un débit de 1 mL/min avec un volume d'injection de 20 μ L. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 10 mg/mL et filtrés sur filtre Millipore de porosité 0,45 μ m. Les analyses ont été réalisées grâce à un système Viscotek GPCMax VE 2001 équipé d'une colonne de garde (10 mm x 4,6 mm) et de deux colonnes analytiques Viscotek LT5000L Mixed Medium (300 mm x 7,8 mm). La détection a été réalisée au moyen d'un détecteur réfractométrique Viscotek VE3580 et d'un détecteur UV/Visible Viscotek VE 3210. Les résultats sont exprimés en fonction d'une calibration réalisée avec des standards en polystyrène (PS) (Polymer Laboratories).

➤ Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses RMN ^1H ont été effectuées dans du chloroforme deutéré sur un spectromètre Bruker AMX300 opérant à 300 MHz et les analyses RMN DOSY (technique de RMN à deux dimensions combinant le déplacement chimique et le coefficient d'autodiffusion) dans du chloroforme deutéré ou du DMSO deutéré sur un spectromètre Bruker Avance III opérant à 600 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport à la référence tétraméthylsilane (TMS).

➤ Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres IRTF ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer 1760 équipé d'un système ATR (réflexion totale atténuée) mono-réflexion permettant de faire les analyses sur des échantillons solides ou liquides.

4.2. Caractérisations thermiques et mécaniques

➤ Analyse thermogravimétrique (TGA)

Les températures de début de dégradation (*onset*) des polymères ont été déterminées par analyses TGA réalisées sur un appareil Perkin-Elmer TGA6 en appliquant un programme de chauffage de 30 à 400°C à une vitesse de 10°C/min sous un flux de diazote de 20 mL/min.

➤ **Analyse enthalpique différentielle (DSC)**

Les transitions de phase des polymères ont été étudiées par DSC sous un flux de diazote grâce à un appareil Perkin-Elmer DSC6000. Différents programmes thermiques ont été utilisés en fonction du polymère étudié. Classiquement, les échantillons ont subi une première étape de chauffage rapide suivie d'une étape de refroidissement et d'une deuxième étape de chauffage plus lent. Les mesures ont été effectuées sur les deux dernières étapes.

➤ **Essais mécaniques en traction**

Les propriétés mécaniques en traction des polymères ont été déterminées grâce à un banc de traction Instron 4444 à une vitesse de déplacement de 5 mm/min et à une température de 37°C (sauf indication contraire). Les échantillons ont été étirés jusqu'à la rupture et leur profil déformation-contrainte tracé afin de mesurer leur module d'Young E, leurs propriétés à la limite d'élasticité (σ_y et ϵ_y) et à la rupture (σ_r et ϵ_r).

➤ **Analyse mécanique cyclique**

Les propriétés de viscoélasticité des matrices textiles ont été étudiées avec un appareil d'analyse mécanique dynamique (DMA) Perkin-Elmer DMA7. Pour cela, les échantillons fixés sur des mors ont subi 100 cycles de traction (1 MPa pendant 30 sec) et de relaxation (0 MPa pendant 90 sec).

4.3. Caractérisations biologiques

➤ **Lecteurs de plaques**

Deux spectromètres ont été utilisés au cours de cette thèse dans le cadre des tests *PrestoBlue*. Le premier est un photomètre à filtres pour microplaque Thermo Scientific Multiskan FC permettant d'effectuer des mesures d'absorbance. Il a été employé avec des filtres de 570 nm et de 595 nm (longueur d'onde de référence utilisée pour la normalisation des résultats). Le second appareil utilisé est un lecteur de plaques multimode à balayage Thermo Scientific Varioskan Flash permettant de réaliser à la fois des mesures d'absorbance et de fluorescence. Il a été utilisé en fluorescence à 560 nm (longueur d'onde d'excitation) et 590 nm (longueur d'onde d'émission).

➤ **Microscopes confocaux**

L'observation de cellules après marquage fluorescent a été effectuée grâce à deux systèmes de la plate-forme technologique Montpellier RIO Imaging (MRI) : un microscope confocal à fluorescence droit Leica Microsystems TCS SP5 X du plateau MRI INM et un microscope macroconfocal à fluorescence Leica Microsystems Macroconfocal LSI du plateau MRI IGH. Dans les deux cas, les images obtenues ont été traitées avec les logiciels Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite (LAS AF Lite) et ImageJ. Les reconstitutions 3D ont été faites grâce au logiciel ImageJ doté des modules d'extension LOCI et ImageJ 3D Viewer.

➤ **Extraction d'ARN totaux et RT-qPCR**

Les ARN totaux sont extraits grâce au RNeasy Mini kit et à l'automate QIAcube (Qiagen) suivant les instructions du fabricant à partir des cellules et des tissus préalablement lysés dans le tampon de lyse du kit et par broyage mécanique ou passage dans une aiguille 21G. La concentration des solutions d'ARN est déterminée par mesure de leur absorbance à 260 nm grâce à un spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) et les rapports des absorbances à 230, 260 et 280 nm (A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230}) permettent de vérifier la pureté des ARN.

La transcription des ARNm (500 à 1000 ng) en ADN_c est effectuée grâce à la transcriptase inverse M-MLV conformément aux recommandations du fournisseur (Invitrogen, Fisher Scientific). Le mélange réactionnel est composé de Random Hexamer Primer 2.5 μ M, de dNTP 0.5 mM, du tampon *first strand* 1X, de DTT 10 mM et de la M-MLV transcriptase inverse 100U ainsi que de l'ARN dans un volume total de 20 μ l. La réaction de RT, réalisée à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler (Eppendorf), comporte une étape d'hybridation de 10 min à 25°C, une étape de transcription de 50 min à 37°C et une étape d'inactivation de 15 min à 70°C.

Enfin, l'amplification des ADN_c (10 ng par réaction) est réalisée par PCR en temps réel en présence de SYBR Green I Master 1X (Roche Applied Science) et du couple d'amorces spécifiques à 0,5 μ M chacune (Eurofins, MWG) (**Tableau II-5**) avec un thermocycleur LightCycler 480 (Roche Applied Science). La réaction de PCR comprend une première phase de dénaturation de 5 minutes à 95°C puis la répétition 40 fois du cycle dénaturation / hybridation / élongation (15 sec à 95°C, 10 sec à 64°C, 20 sec à 72°C).

Les résultats sont calculés selon la formule $2^{-\Delta Ct}$ après normalisation par le gène de référence (ou gène de ménage) glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ($\Delta Ct = Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ GAPDH}$).

Gène	Séquence d'amorces	
GAPDH	sens	5'-GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA-3'
	antisens	5'-GTG GTT CAC ACC CAT CAC AA-3'
Collagène I Col I	sens	5'-TGT TCA GCT TTG TGG ACC TC-3'
	antisens	5'-TCA AGC ATA CCT CGG GTT TC-3'
Collagène III Col III	sens	5'-CGG TGA ACG GGG CGA AGC TGG TT-3'
	antisens	5'-GAC CCC TTT CTC CTG CGG CTC CT-3'
Scleraxis Scx	sens	5'-CGG CGA GAA CAC CCA GCC CAA-3'
	antisens	5'-TCT TTC TGT CAC GGT CTT TGC TCA ACT-3'
Ténascine-C Tnc	sens	5'-TCG TGG GCG GTG TGT GGA GAA CG-3'
	antisens	5'-GCG GTC GAA GCA GTC GTT GGG G-3'
Ténomoduline Tnmd	sens	5'-CGC CAC ACC AGA CAA GCA AGC G-3'
	antisens	5'-AGG TTC ACA GAC ACG GCG GCA-3'

Tableau II-5 : Séquences d'amorces de RT-qPCR pour les gènes de souris (Mus musculus)

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT DE BIOMATERIAUX POLYMERES DEGRADABLES

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE BIOMATERIAUX POLYMERES DEGRADABLES

Ce chapitre est consacré au développement et à l'étude des différents biomatériaux polymères développés pour la conception de matrices de régénération ligamentaire. Les synthèses et propriétés de ces matériaux y sont décrites en commençant par les polymères thermoplastiques.

1. Copolymères thermoplastiques

1.1. Synthèse et essais préliminaires

1.1.1. Synthèse et propriétés

Dans un premier temps, plusieurs copolymères ont été synthétisés par POC du lactide en employant le Pluronic ou le Tetronic comme macroamorceurs de la polymérisation et comme blocs centraux. Le but principal de ces premières synthèses était d'évaluer l'influence de la cristallinité du PLA et de la nature du bloc central sur les propriétés finales des copolymères obtenus. Des masses molaires de 100 et 120 kg/mol ont été respectivement choisies pour les copolymères constitués de Pluronic et de Tetronic dans le but d'obtenir des composés de balances hydrophile – hydrophobe similaires et d'éliminer l'influence de ce paramètre.

Les copolymères obtenus ont tout d'abord été caractérisés chimiquement et thermiquement. A titre d'illustration, nous présenterons les données du copolymère 94P100. Les spectres RMN (*Figure III-1*) ont permis de confirmer la présence dans les produits finaux des blocs PEG et PPG des macroamorceurs et des blocs de PLA. Cependant, pour vérifier que la polymérisation du lactide a bien eu lieu aux extrémités des amorceurs et qu'il n'y a pas eu formation d'homopolymère de PLA, il a été nécessaire d'effectuer des caractérisations supplémentaires. Les analyses GPC ont montré que les copolymères présentaient des chromatogrammes monomodaux (*Figure III-2*) ce qui suggère la présence d'un unique polymère dans le composé étudié. Cela a été confirmé grâce aux spectres de RMN DOSY (*Figure III-3*) où tous les pics attribués aux différents blocs du copolymère sont

associés à un unique coefficient de diffusion (un second coefficient correspond au CDCl_3 , solvant d'analyse).

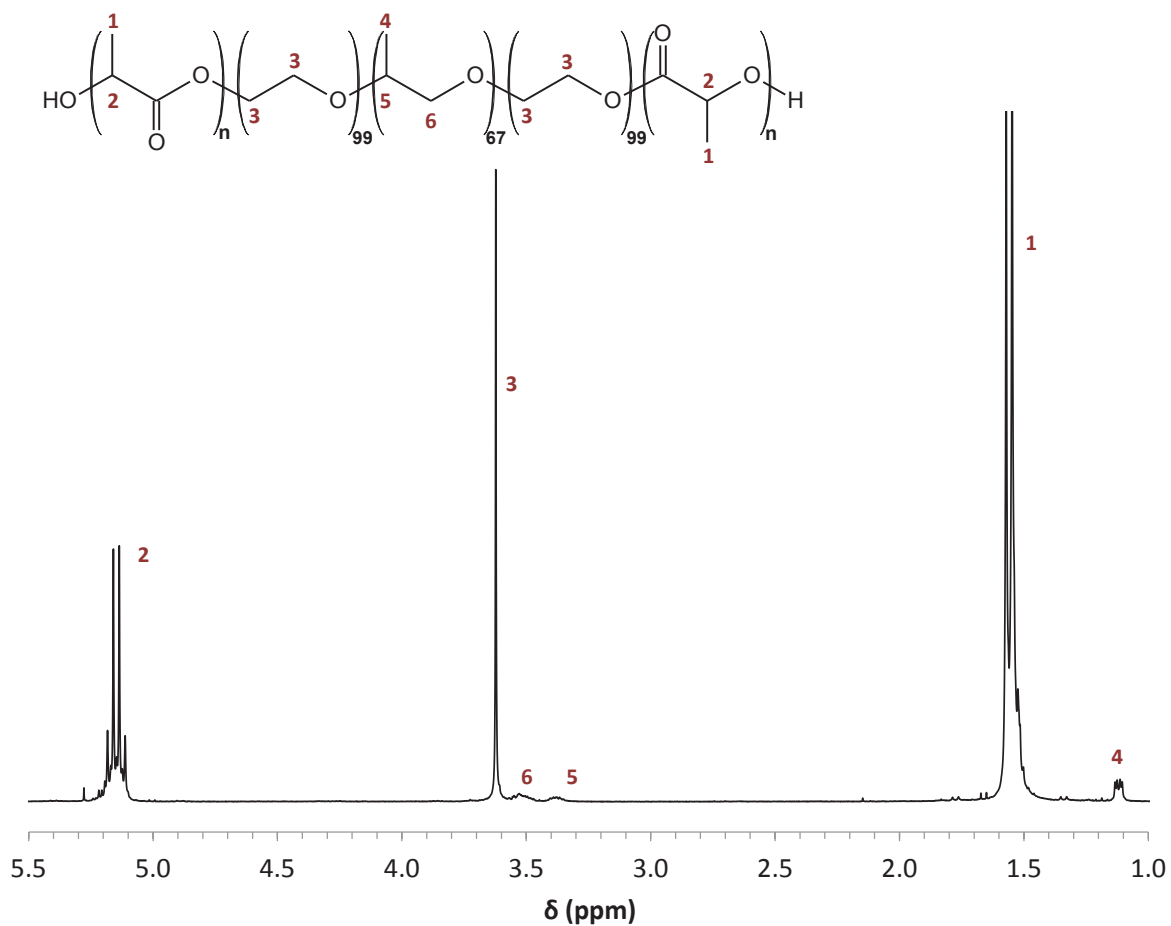


Figure III-1 : Spectre RMN ^1H du copolymère 94P100

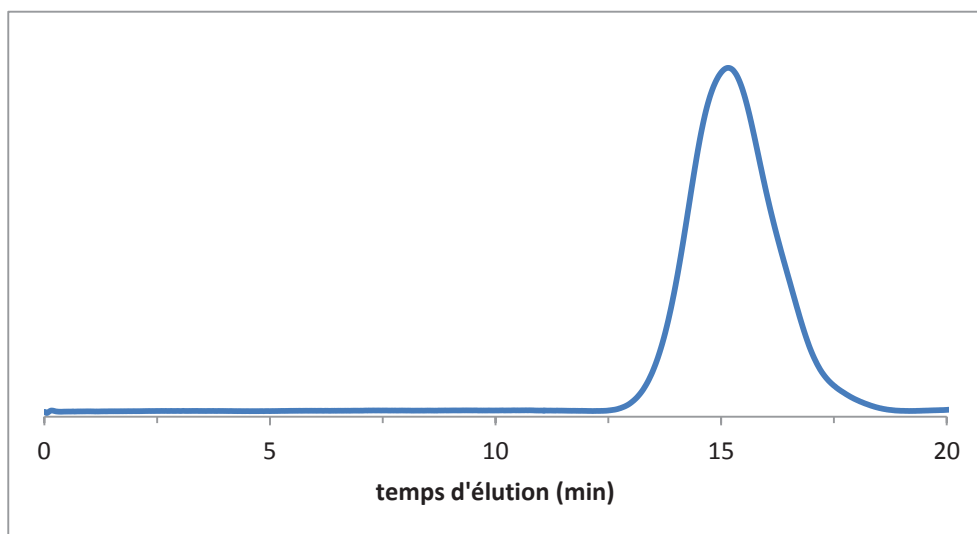


Figure III-2 : Chromatogramme GPC du copolymère 94P100

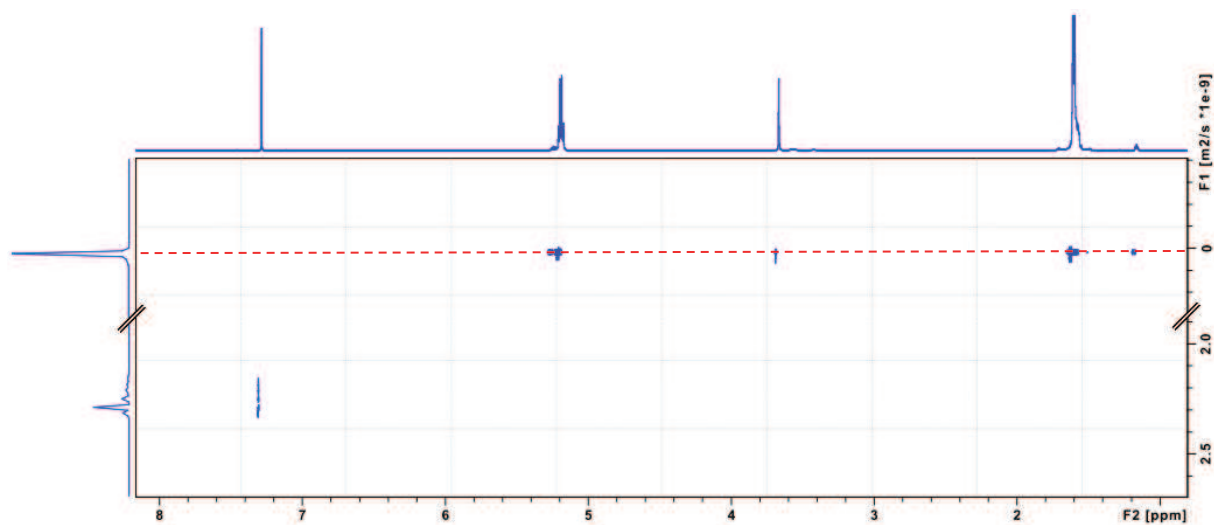


Figure III-3 : Spectre RMN DOSY du copolymère 94P100

La détermination par GPC des masses molaires des copolymères synthétisés a montré des résultats relativement éloignés des valeurs théoriques attendues. Ce n'est pas le cas des valeurs calculées à partir de l'analyse des spectres RMN en accord avec les valeurs théoriques (**Tableau III-1**). Ces différences peuvent trouver plusieurs origines. Les standards PS utilisés pour la calibration de la GPC sont tout d'abord connus pour générer des valeurs inexacts dans le cadre de l'étude de polyesters aliphatiques [258, 259]. La littérature évoquant ce problème suggère cependant des valeurs réelles environ deux fois inférieures aux valeurs mesurées, ce qui ne semble pas être le cas pour notre étude. Il est donc probable que ces différences s'expliquent à la fois par l'utilisation d'un étalonnage PS, mais aussi par la tendance qu'ont les chaînes de polymère amphiphiles à se replier sur elles-mêmes provoquant ainsi une diminution du volume hydrodynamique. D'autre part, il peut y avoir des interactions entre les blocs hydrophiles du PEG et les colonnes de la GPC, ce qui provoquerait une modification du temps de rétention (cas typique des chromatogrammes de PEG présentant des pics légèrement asymétriques, élargis du côté des faibles masses).

En se basant sur les valeurs de masses molaires calculées par RMN plus fiables, on constate que la synthèse des copolymères semble bien contrôlée dans la mesure où les masses molaires théoriques et expérimentales sont relativement proches (écart maximal de 22 %) avec des dispersités inférieures à 2,4.

Copolymère	\overline{Mn} (kg/mol)			Đ	T_g (°C)	T_f (°C)	ΔH_m (J/g)
	théorique	RMN	GPC				
50P100	100	99,8	72,6	1,7	36,4	x	x
70P100	100	122,0	40,1	2,1	34,2	x	x
94P100	100	112,3	49,5	2,4	x	147,6	24,9
50T120	120	137,1	100,1	2,4	31,8	x	x
70T120	120	141,7	93,6	1,6	34,5	x	x
94T120	120	130,0	101,0	1,8	x	149,7	13,2

Tableau III-1 : Propriétés des copolymères P100 et T120

Les propriétés thermiques des copolymères ont été déterminées par DSC (**Tableau III-1**). Cette étude a permis de mettre en évidence les différences structurales liées à la cristallinité des blocs de PLA. Tous les copolymères à l'exception des 94P100 et 94T120, c'est-à-dire ceux constitués du PLA le plus cristallin, ont présenté des transitions vitreuses (**Figure III-4**). A l'inverse, des pics de fusion n'ont pas été observés sur les thermogrammes des copolymères constitués de PLA₅₀ ou de PLA₇₀ tandis que d'importants pics de fusion sont apparus avec les copolymères à base de PLA₉₄.

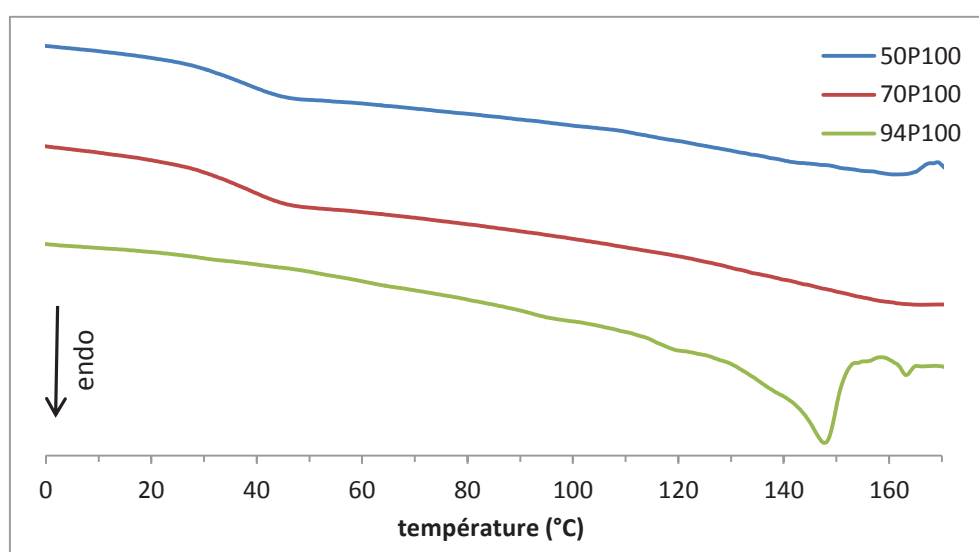


Figure III-4 : Thermogrammes DSC des copolymères P100

Il est important de noter que les valeurs de T_g des copolymères présentant des transitions vitreuses sont comprises entre 31 et 37 °C. La transition vitreuse est un phénomène qui induit d'importantes modifications physiques au sein d'un polymère et notamment de fortes variations des propriétés mécaniques. Dans le cadre d'une implantation dans le corps humain dont la température normale est d'environ 37°C et d'une reconstruction du ligament où le rôle mécanique de la prothèse est primordial, ces valeurs de T_g peuvent donc poser problème. Nous verrons par la suite que cette T_g est étroitement liée au choix de la masse molaire du copolymère.

1.1.2. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des copolymères préparés sous différentes mises en forme ont cependant été évaluées lors de tests d'étirement puisqu'il s'agit du principal critère de sélection. Tout d'abord, les trois copolymères à base de Pluronic (série P100) ont été étudiés à température ambiante après préparation de films par évaporation de solvant. Les profils déformation-contrainte présentés dans la **Figure III-5** sont représentatifs des résultats obtenus. Ils montrent clairement l'importance de la cristallinité du PLA dans la mesure où le 94P100 constitué de PLA₉₄ (plus cristallin que le PLA₅₀ ou le PLA₇₀) présente un comportement élastique suivi d'une déformation plastique et une rupture précoce par rapport aux deux copolymères constitués de PLA essentiellement amorphe qui présentent un comportement plus ductile et plastique avec des valeurs de déformation à la rupture élevées.

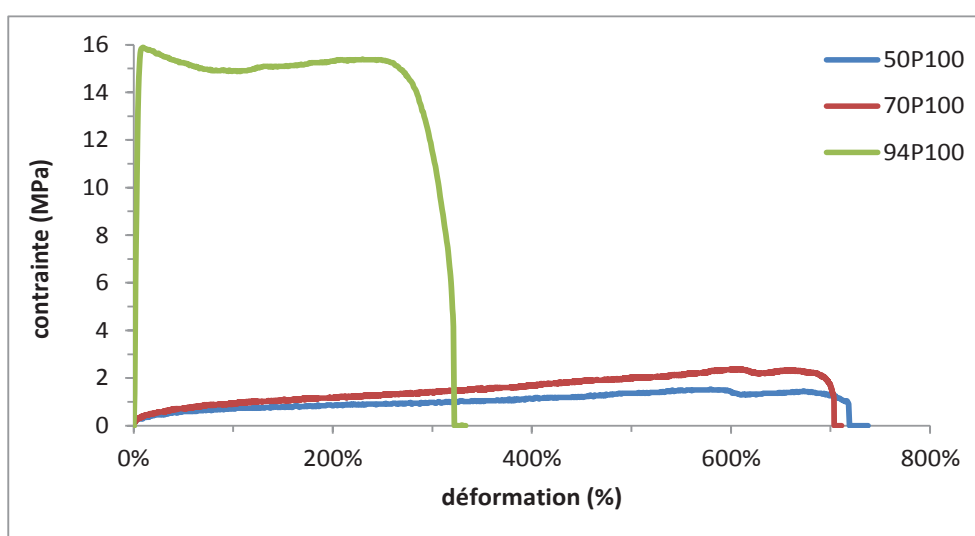


Figure III-5 : Profils déformation-contrainte en traction des copolymères P100

Les valeurs tirées de ces courbes de traction (**Tableau III-2**) confirment ces observations avec par exemple des valeurs de E , σ_y et σ_r particulièrement basses pour les polymères 50P100 et 70P100, en particulier si l'on se réfère aux valeurs du LCA. Pour des films obtenus par évaporation de solvant, le copolymère 94P100 semble donc être le seul de ces polymères capable de répondre aux exigences mécaniques nécessaire à la préparation d'un support ligamentaire. Par ailleurs, il est intéressant de noter les valeurs élevées des écarts types qui suggèrent une faible reproductibilité des résultats. Dans l'hypothèse où cette mauvaise reproductibilité pourrait être liée à la méthode de mise en forme par évaporation de solvant et, dans un but de comparaison, des tests de traction similaires ont été effectués sur les copolymères P100 mais après une mise en forme par moulage à chaud sous presse. Les matériaux obtenus de cette manière sont évidemment beaucoup plus denses que ceux préparés par évaporation de solvant et leurs propriétés mécaniques s'en trouvent augmentées (**Tableau III-2**), en particulier pour les 50P100 et 70 P100. Si les valeurs de E obtenues avec ces matériaux sont compatibles avec celles d'un ligament, les contraintes σ_y et σ_r restent faibles pour ces deux polymères. Cependant, même en employant cette méthode de mise en œuvre les résultats confirment que le 94P100 reste le seul composé susceptible de convenir au cahier des charges. Par ailleurs, on peut constater que la mise en forme par moulage a conduit à une diminution de la plupart des écarts types sur ces propriétés mécaniques et par conséquent à une amélioration de la reproductibilité des résultats. Une mise en forme plus rigoureuse telle que celle-ci permet donc d'avoir une meilleure homogénéité des matériaux fabriqués, ce qui est essentiel dans un but de caractérisation ayant pour but une sélection des polymères.

Polymère		E (MPa)	σ_y (MPa)	ϵ_y (%)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
évaporation de solvant	50P100	9 +/- 2	0,3 +/- 0,1	2,9 +/- 1,0	1,9 +/- 0,4	869 +/- 139
	70P100	22 +/- 11	0,3 +/- 0,0	1,2 +/- 0,3	2,6 +/- 0,6	516 +/- 305
	94P100	355 +/- 90	9,0 +/- 3,5	2,6 +/- 0,6	17,7 +/- 3,3	468 +/- 149
moulage	50P100	149 +/- 46	2,7 +/- 1,0	2,5 +/- 0,5	8,3 +/- 3,7	888 +/- 187
	70P100	203 +/- 51	5,3 +/- 0,6	3,6 +/- 0,5	11,7 +/- 0,6	983 +/- 85
	94P100	399 +/- 30	9,5 +/- 3,4	3,3 +/- 1,5	18,7 +/- 4,9	57 +/- 11
LCA		49 - 163	x	7 - 16	14 - 36	19 - 36

x = information non disponible

Tableau III-2 : Propriétés mécaniques des copolymères P100 préparés par évaporation de solvant et par moulage (tests sur échantillons secs et à température ambiante)

Des observations similaires ont été réalisées avec la série de copolymères T120, le 94T120 semblant être le seul fournissant des résultats prometteurs, ce qui a été confirmé à la fois par une première série d'essais de traction effectuée comme précédemment à température ambiante et sur des échantillons secs, mais aussi sur une seconde réalisée à 37°C et sur des échantillons à l'état hydraté (après 24 heures d'immersion dans du PBS maintenu à 37°C). La comparaison des résultats de ces deux séries d'expériences a permis de mettre en évidence l'influence des conditions environnementales sur le comportement mécanique des polymères. L'application de conditions proches d'un environnement physiologique s'est en effet traduite par une diminution de toutes les propriétés mécaniques à l'exception de ϵ_r (**Figure III-6** et **Tableau III-3**).

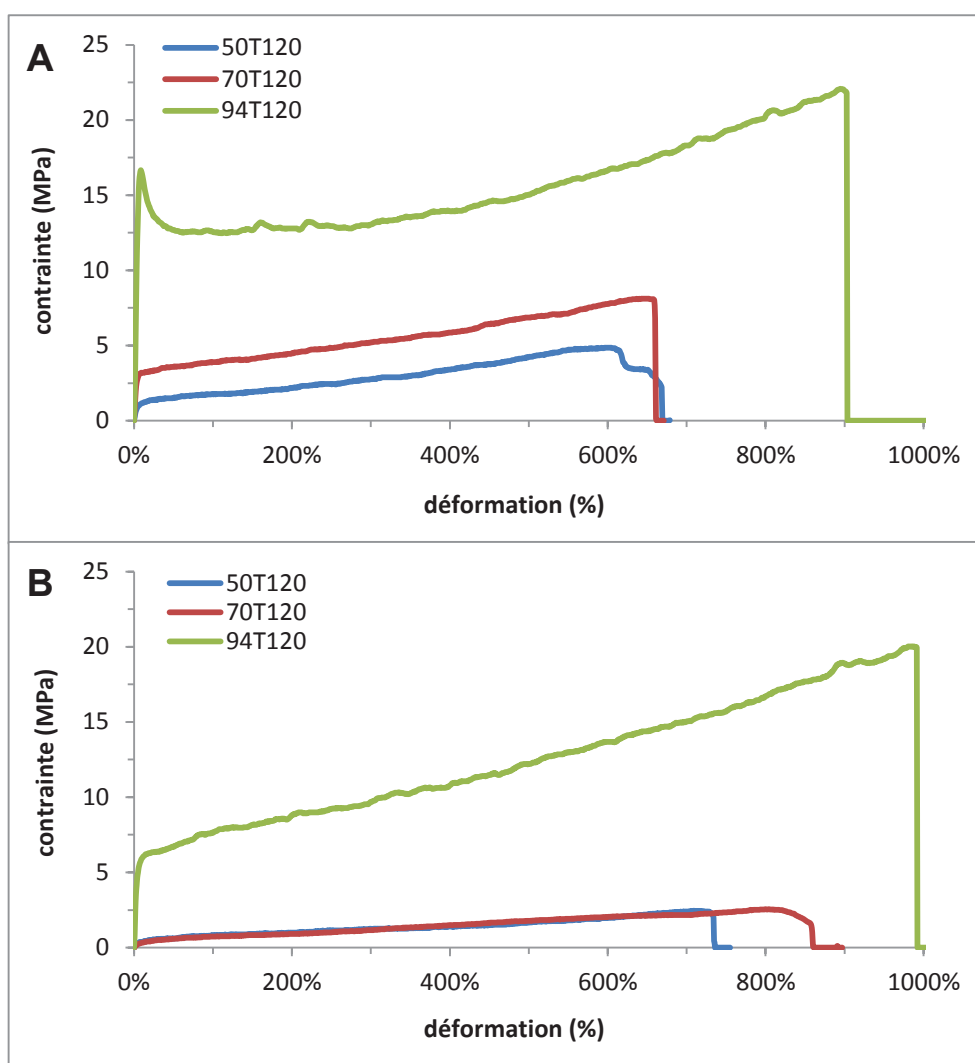


Figure III-6 : Profils déformation-contrainte en traction des copolymères T120 secs et à température ambiante (A) et hydratés à 37 °C (B)

Cette diminution, particulièrement marquée pour les polymères les moins cristallins 50T120 et 70T120 s'explique certainement à la fois par les effets de la température et par l'immersion des échantillons dans le PBS. Etant donné leur composition chimique, ces polymères sont très hydrophobes et il est peu probable qu'une immersion de cette durée ait provoqué une forte hydratation, aucun gonflement ou changement d'aspect n'a d'ailleurs été observé lors de la sortie des matériaux de la solution d'immersion. Il est toutefois possible qu'il y ait eu inclusion de molécules d'eau qui auraient alors joué un rôle de plastifiant des polymères. La température peut également très bien expliquer ces changements de propriétés puisque nous avons constaté précédemment que les T_g de la plupart de ces copolymères sont légèrement inférieures à 37°C.

Il est à noter que si ce sont les deux autres copolymères qui ont été les plus sensibles à ces conditions, le 94T120 a également subi une diminution de ses propriétés mécaniques, son module d'élasticité E ayant diminué d'environ 400 à 200 MPa et sa contrainte σ_y d'environ 8 à 2,5 MPa (l'impact a été beaucoup plus limité sur les autres valeurs). Bien que les transitions vitreuses des copolymères les plus cristallins 94P100 et 94T120 n'aient pas été détectées par DSC, les modifications des propriétés mécaniques observées sur le 94T120 semblent bien indiquer l'existence de ces transitions à des températures relativement proches de 37°C.

Polymère		E (MPa)	σ_y (MPa)	ε_y (%)	σ_r (MPa)	ε_r (%)
secs T ambiante	50T120	29 +/- 4	0,6 +/- 0,2	2,0 +/- 0,5	4,8 +/- 0,4	610 +/- 152
	70T120	89 +/- 10	2,0 +/- 0,3	2,2 +/- 0,3	8,0 +/- 0,6	659 +/- 221
	94T120	382 +/- 81	8,3 +/- 2,1	2,8 +/- 0,7	21,8 +/- 4,1	903 +/- 278
hydratés 37°C	50T120	14 +/- 4	0,1 +/- 0,0	1,0 +/- 0,3	2,2 +/- 0,2	666 +/- 101
	70T120	5 +/- 2	0,2 +/- 0,1	3,7 +/- 0,4	2,9 +/- 1,0	714 +/- 186
	94T120	198 +/- 53	2,5 +/- 0,5	1,7 +/- 0,7	19,3 +/- 0,8	941 +/- 46
LCA		49 - 163	x	7 - 16	14 - 36	19 - 36

x = information non disponible

Tableau III-3 : Propriétés mécaniques des copolymères T120 préparés par moulage (secs à température ambiante et hydratés à 37°C)

En conclusion, la réalisation de ces essais préliminaires de synthèse et de caractérisation nous a conduits à réduire le nombre de formulations de copolymères envisagées pour la fabrication d'un support de régénération ligamentaire. Les copolymères amorphes, c'est-à-dire ceux constitués de PLA₅₀ ou de PLA₇₀, présentent non seulement des propriétés mécaniques bien inférieures à celles des copolymères à base de PLA₉₄ mais se sont également révélés être beaucoup plus sensibles aux conditions environnementales et plus particulièrement à la température. Compte tenu de cette première étude, il paraît évident que la synthèse de copolymères composés de blocs PLA à relativement haute cristallinité est nécessaire pour pouvoir espérer répondre aux exigences du projet. Par ailleurs, peu de différences significatives ont été constatées sur le plan mécanique entre les copolymères constitués de Pluronic et de Tetronic. La plus notable est la déformation de rupture ϵ_r bien plus élevée pour 94T120 que pour 94P100 (941 % contre 57 % à l'état non hydraté et température ambiante), certainement due à la structure en étoile du Tetronic et aux enchevêtrements de chaînes qui en découlent. Les deux valeurs sont cependant amplement suffisantes si l'on considère les valeurs du LCA (ϵ_r entre 19 et 36 %), ces deux macroamorceurs ont donc été conservés pour la suite du projet.

1.2. Etude de dégradation

1.2.1. Synthèse et propriétés

Suite aux conclusions tirées des essais préliminaires, une nouvelle série de copolymères a été synthétisée et caractérisée. En tenant compte des considérations liées à la cristallinité du PLA et à la T_g évoquées plus tôt, nous nous sommes focalisés sur deux paramètres : la cristallinité des blocs PLA (en comparant des blocs de PLA₉₄ et de PLA₉₆) ainsi que la masse molaire totale (en comparant des copolymères de masse molaire de 100 et 200 kg/mol). Les copolymères synthétisés dans ce but et leurs propriétés sont répertoriés dans le **Tableau III-4**. Comme pour la première série de synthèses, les analyses RMN et GPC indiquent un bon contrôle de la synthèse avec des dispersités n'excédant pas 1,7 et des différences entre les masses molaires théoriques et expérimentales (mesurées grâce à la RMN) comprises entre 15 et 23 % pour les polymères P100 et T100 et entre 11 et 20 % pour les P200 et T200. Contrairement à la première série, des transitions vitreuses de faible intensité ($\Delta C_p \leq 0,6 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{°C}^{-1}$) ont cette fois pu être observées pour chaque copolymère avec des valeurs de T_g proches de 35°C pour les composés de 100 kg/mol et supérieures à 40 °C pour ceux de 200 kg/mol.

Copolymère	\overline{Mn} (kg/mol)			D	T _g (°C)	T _f (°C)	ΔH_m (J/g)
	théorique	RMN	GPC				
94P100	100	123,3	65,0	1,6	34,4	141,4	12,4
96P100	100	116,4	57,7	1,7	35,4	156,4	16,2
94T100	100	115,1	60,3	1,3	34,3	141,8	12,6
94P200	200	223,0	114,0	1,6	53,8	145,4	19,9
96P200	200	222,6	89,0	1,7	58,1	155,6	25,1
94T200	200	240,4	93,3	1,6	43,9	147,8	10,5

Tableau III-4 : Propriétés des copolymères P100, T100, P200 et T200

1.2.2. Prise d'eau et perte de masse

La suite de l'étude a consisté à soumettre ces six polymères à un test de dégradation *in vitro* dans une solution de PBS maintenue à 37°C. L'objectif de cette expérience était d'évaluer les conséquences de l'hydratation et de la dégradation sur les propriétés de ces matériaux et plus particulièrement la masse, la masse molaire, les propriétés thermiques ainsi que les propriétés mécaniques. Il s'agit d'un test de dégradation à moyen terme (7 semaines) destiné à affiner la sélection de polymères présentant des caractéristiques satisfaisantes pour l'application ligamentaire visée. Pour cela, les différents échantillons ont tout d'abord été pesés avant immersion, après immersion et après séchage, ce qui a permis de déterminer leur prise d'eau à l'état hydraté et leur perte de masse après séchage (cf. § II.1.3).

Comme cela a été expliqué précédemment (cf. § I.2.3.3), la dégradation des polyesters aliphatiques tels que le PLA s'effectue suivant un processus bien particulier. La première étape de ce processus est l'insertion des molécules d'eau au sein du réseau polymère, ce qui se traduit par une augmentation de la masse du matériau. Parmi les copolymères étudiés, trois tendances distinctes ont été observées (**Figure III-7**). La masse des copolymères de 100 kg/mol a augmenté de manière importante dès la deuxième semaine d'immersion avec des valeurs comprises entre 9 et 15 %. Cette augmentation s'est poursuivie jusqu'à atteindre des valeurs allant jusqu'à 25 % après sept semaines. Pour des polymères dégradables, cette importante prise d'eau peut s'expliquer par l'hydrophilie des copolymères et par un déclenchement précoce du processus de dégradation qui provoquerait le raccourcissement des chaînes et favoriserait ainsi l'hydratation. On peut néanmoins noter la différence qu'il existe

entre les copolymères 94P100 et 94T100 comparés au copolymère 96P100 pour lequel l'augmentation de la prise d'eau a été moins importante (seulement 13 % après 7 semaines). Cette différence provient de la cristallinité plus élevée du PLA₉₆ limitant l'insertion de l'eau au sein du polymère.

Pour les copolymères de 200 kg/mol en revanche, s'il semble y avoir eu une légère augmentation de la masse au cours des deux premières semaines d'immersion, celle-ci est restée faible (valeurs comprises entre 5 et 7 %). De plus, cette augmentation ne s'est pas poursuivie par la suite, les valeurs d'adsorption n'excédant pas 8 % à la fin de l'expérience. Ces résultats sont en adéquation avec les différentes compositions des copolymères puisque les échantillons de 200 kg/mol sont constitués de blocs de PLA beaucoup plus longs que les 100 kg/mol, ce qui leur confère un caractère hydrophobe beaucoup plus marqué et ralentit l'insertion et l'adsorption des molécules d'eau.

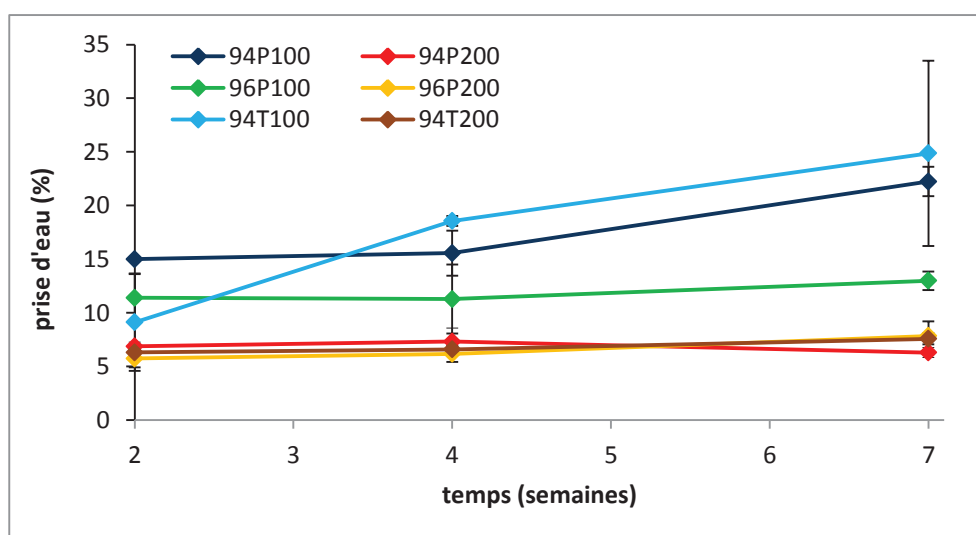


Figure III-7 : Evolution de la prise d'eau des copolymères pendant la dégradation

Le calcul des pertes de masse après immersion et séchage n'a en revanche apporté que très peu d'informations. La masse des échantillons n'a en effet que très peu diminué au cours de cet essai de dégradation (aucune perte de masse n'a excédé 5 %). Cette observation reste toutefois en accord avec le processus de dégradation attendu évoqué plus tôt, les chaînes dégradées n'ayant dans les premiers temps pas la capacité de diffuser hors du matériau et la diminution de la masse étant par conséquent supposée intervenir ultérieurement [82, 260, 261].

1.2.3. Evolution de la masse molaire

La deuxième étape du processus de dégradation après l'hydratation du polymère est la scission hydrolytique des chaînes conduisant à une diminution de la masse molaire. C'est pour étudier ce phénomène que les échantillons ont été analysés par RMN et GPC au cours de ce test de dégradation. Bien que les calculs issus des spectres RMN semblent avoir fourni les résultats les plus fiables jusqu'ici, les données obtenues pour cette étude se sont avérées être aberrantes (diminution puis augmentation de la masse molaire au cours du temps). Ces résultats sont probablement liés à la dégradation progressive des blocs de PLA constituant les matériaux qui aurait ainsi modifié leur composition globale et, par conséquent, leur balance hydrophile/hydrophobe et leur solubilité dans le solvant d'analyse RMN (en raison de la dégradation des blocs PLA, on peut assister à une augmentation de l'hydrophilie des macromolécules donc à une diminution de leur solubilité dans le chloroforme). Ce type de changement a pour conséquence d'entraîner un masquage partiel de certains signaux utilisés pour effectuer les calculs [262, 263]. C'est pourquoi, malgré les valeurs moins précises qu'elles sont supposées fournir, les mesures obtenues pour GPC ont été préférées afin d'étudier l'évolution de la masse molaire.

Les masses molaires \overline{Mn} des copolymères ont donc été déterminées par GPC et exprimées en pourcentage par rapport à leurs valeurs initiales (**Figure III-8**). Une diminution globale de la masse molaire au cours du temps a été observée pour tous les copolymères étudiés. Cependant, on peut là encore distinguer deux groupes de produits : une diminution moyenne de 41 % après 7 semaines a été observée pour les copolymères de 100 kg/mol contre seulement 22 % pour ceux de 200 kg/mol. Ces résultats, comme l'étude de la prise d'eau, semblent confirmer que le caractère hydrophobe des copolymères retarde le processus de dégradation hydrolytique. Il est par ailleurs intéressant de noter que parmi les 100 kg/mol, le 96P100 a également subi une diminution de masse molaire plus réduite que 94P100 et 94T100, confirmant là aussi le ralentissement de la dégradation dû à une plus haute cristallinité des blocs PLA₉₆. Aucune différence liée à la nature du bloc macroamorceur n'a été observée.

Il est également important de noter que les chromatogrammes obtenus par GPC avec tous les copolymères étudiés sont restés monomodaux avec des dispersités comprises entre 1,5 et 2,1 tout au long de la dégradation, ce qui semble respecter le processus, l'apparition d'un épaulement voire d'une bimodalité étant attendue plus tard dans le processus de dégradation [82, 264].

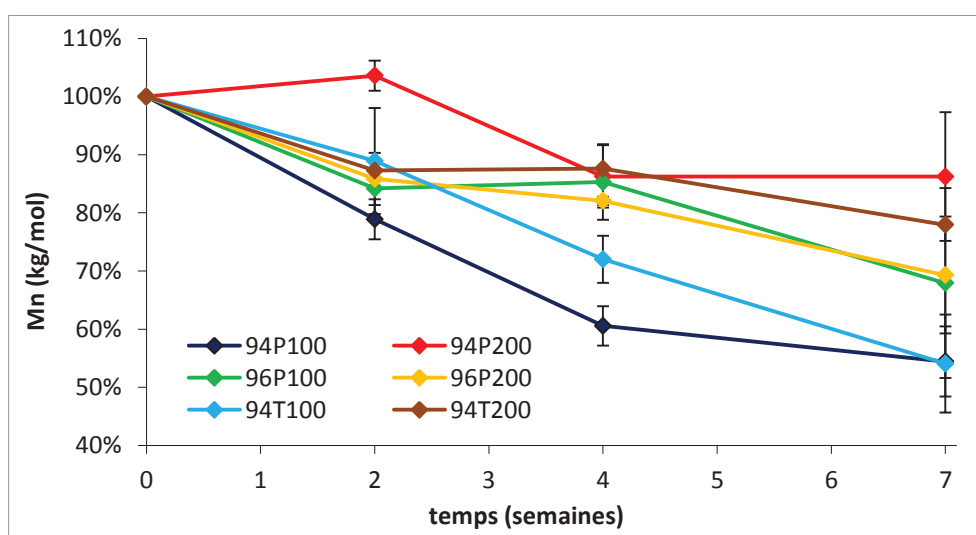


Figure III-8 : Evolution de la masse molaire des copolymères pendant la dégradation

1.2.4. Evolution des propriétés thermiques

Les propriétés thermiques des matériaux ont également été étudiées par DSC au fur et à mesure de la dégradation, celles-ci étant intimement liées aux autres caractéristiques des copolymères. Les thermogrammes obtenus ont montré une évolution bien particulière, comme dans le cas du 96P200 (**Figure III-9**). Le premier signe de la dégradation est l'apparition dès la deuxième semaine d'un pic de cristallisation froide proche de 120°C. Au cours de la dégradation, ce pic s'est progressivement élargi et la température de cristallisation froide a diminué pour atteindre des valeurs proches de 110°C. Un phénomène similaire s'est produit pour le pic de fusion situé entre 140 et 160°C selon la composition du copolymère. Au cours de l'immersion, un élargissement du pic ainsi que l'apparition d'un second pic de fusion à une température inférieure d'environ 10°C du premier ont en effet été observés.

Tous ces phénomènes liés à la cristallinité des copolymères trouvent leur origine dans la dégradation et le raccourcissement des chaînes de PLA. Les chaînes plus courtes engendrées par les scissions par hydrolyse sont effectivement dotées d'une plus grande mobilité. Cette mobilité accrue leur permet, grâce à un apport de chaleur, de se réorganiser et de former par ce phénomène de cristallisation froide plusieurs structures cristallines caractérisées par des températures de fusion différentes [265, 266].

L'impact de la dégradation semble en revanche plus limité sur la transition vitreuse des copolymères. Si ces transitions sont devenues plus marquées au cours de la dégradation (**Figure III-9**), aucune évolution significative des valeurs de T_g n'a été observée. Il est cependant intéressant de constater que, conformément aux analyses effectuées après la synthèse des copolymères (cf. § III.1.2.1), on peut distinguer deux groupes parmi les échantillons étudiés. En raison de leur masse molaire, les copolymères de 100 kg/mol possèdent des T_g très proches de la température du corps humain globalement comprises entre 32 et 41°C tandis que celles des composés de 200 kg/mol sont comprises entre 47 et 50°C.

Une nouvelle fois, dans la mesure où la transition vitreuse induit des changements de comportement mécanique majeurs pour les polymères thermoplastiques semi-cristallins, il est nécessaire dans le cadre d'applications biomédicales, et en particulier dans un cas comme le nôtre où le rôle du matériau est essentiellement mécanique, d'employer des polymères dont les T_g ne sont pas situées dans le domaine de températures physiologiques. C'est pourquoi les produits de 100 kg/mol ne paraissent pas adaptés aux exigences de notre projet tandis que ceux de 200 kg/mol peuvent toujours être considérés comme potentiellement appropriés.

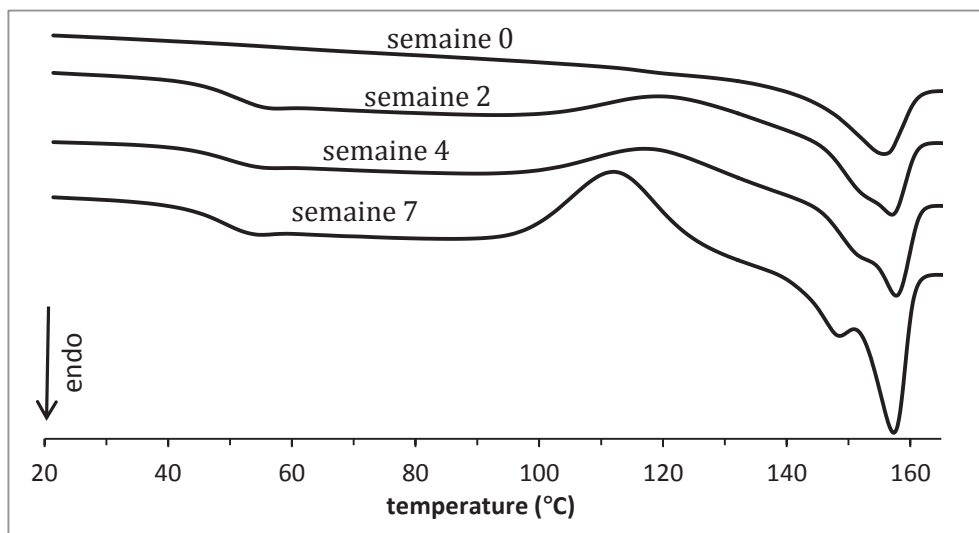


Figure III-9 : Thermogrammes du copolymère 96P200 pendant la dégradation (2nde montée en température)

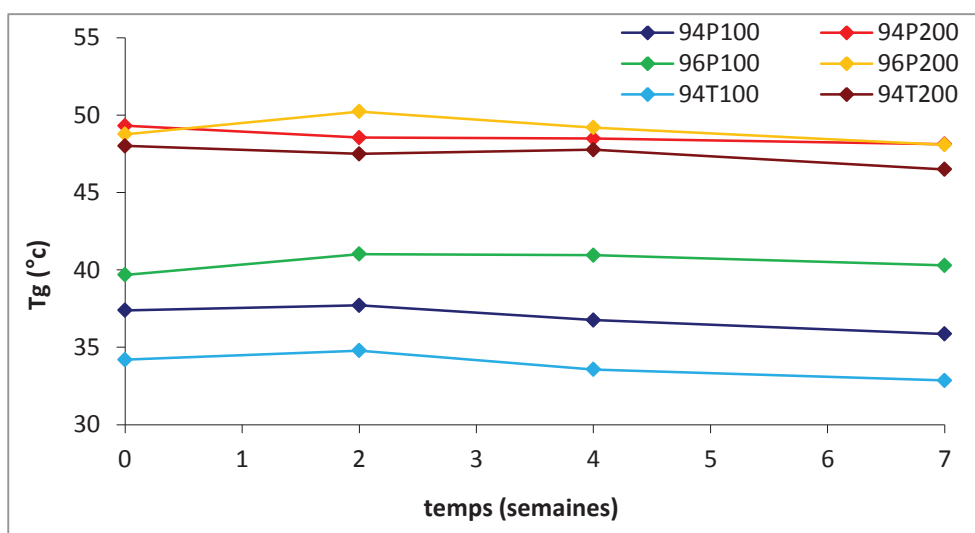


Figure III-10 : T_g des copolymères en fonction du temps de dégradation

1.2.5. Evolution des propriétés mécaniques

Comme tous les autres ligaments, le LCA possède des propriétés mécaniques bien spécifiques. Dans l'optique de la conception d'une matrice de régénération, la structure générée ne doit pas seulement avoir des propriétés proches au moment de l'implantation mais doit aussi assurer sa fonction mécanique jusqu'à ce que les tissus reconstitués soient capables d'assurer à nouveau cette fonction eux-mêmes. C'est pourquoi les propriétés mécaniques en traction de nos copolymères ont été évaluées au fur et à mesure de leur dégradation. Les résultats présentés (Figure III-11) ne concernent que les copolymères de 200 kg/mol, ceux de 100 kg/mol ont en effet tellement été impactés par l'immersion dans la solution de dégradation que la plupart d'entre eux n'ont pas pu être placés entre les mors de la machine de traction sans se rompre. Les rares échantillons qui ont pu être analysés ont de plus présenté des propriétés mécaniques largement inférieures à celles des 200 kg/mol.

L'étude menée sur ces copolymères de 200 kg/mol a tout d'abord révélé que toutes les propriétés mécaniques évaluées à l'exception de la déformation de rupture ϵ_r se sont maintenues à des niveaux relativement constants au cours de la dégradation. Si les modules d'Young (E) ont très peu varié et sont restés dans un domaine de valeurs comprises entre 400 et 650 MPa, σ_r , σ_y et ϵ_y ont quant à eux semblé montrer une tendance commune. Dans un premier temps (pendant les 2 à 4 premières semaines d'immersion), les valeurs de ces caractéristiques ont légèrement augmenté en raison de la dégradation préférentielle des domaines amorphes des copolymères qui a mené à une augmentation de leur cristallinité.

Il s'agit d'un phénomène bien connu concernant le PLA et qui a fait l'objet d'études au sein de notre laboratoire [267]. Suite à cette première phase, la plupart de ces propriétés ont commencé à diminuer en raison de l'hydrolyse des chaînes. Au cours de cette seconde étape, c'est la diminution des masses molaires constatée précédemment qui est devenue le principal paramètre influençant l'évolution des propriétés mécaniques. A partir de la septième semaine, nous pouvons présumer que ces propriétés diminueraient progressivement jusqu'à la dégradation complète des matériaux.

Contrairement à la lente évolution qui a été observée pour les autres caractéristiques, la déformation de rupture ε_r a considérablement diminué (d'un facteur de l'ordre de 20 à 50) dès la deuxième semaine d'immersion, conduisant les copolymères à passer d'un comportement mécanique ductile à fragile. Cette diminution reflète le très fort impact des scissions de chaînes et de la cristallinité sur cette propriété mécanique.

Si l'on s'intéresse aux différentes valeurs mesurées comparativement aux données trouvées dans la littérature concernant le LCA, plusieurs conclusions peuvent être tirées. Les valeurs de modules d'Young obtenues sont bien supérieures à celle du LCA (50 à 160 MPa environ), ce qui pourrait se révéler problématique lors de l'implantation. Cependant, il est *a priori* intéressant d'avoir des valeurs initiales aussi élevées dans la mesure où l'on s'attend à une diminution progressive du module tout au long du processus de dégradation. Les valeurs de ε_r ont en revanche été plus faibles qu'espéré (entre 2,5 et 5,5 % contre 7 à 16 % pour le LCA). Sur la période évaluée, les résultats obtenus pour σ_r se situaient dans la gamme de valeurs recherchée. Enfin, malgré la diminution qui a été observée, les valeurs de ε_r correspondent aux attentes à l'exception du polymère 96P200 qui a présenté des résultats inférieurs aux autres échantillons avant et après la dégradation avec une valeur finale inférieure à 4 %.

Certaines des propriétés évaluées correspondent à ce qui était recherché tandis que d'autres sont trop élevées ou au contraire trop faibles. Malgré toutes les observations effectuées, il est difficile d'apporter une conclusion absolue quant à l'adéquation mécanique des copolymères à partir de ces résultats. Il faut en effet prendre en compte le fait que la technique de mise en œuvre employée pour cette étude (compression à chaud) ne sera certainement pas celle utilisée pour la préparation finale de la matrice de régénération.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'architecture la plus couramment utilisée pour la conception des matrices ligamentaires à partir de polymères thermoplastiques repose sur l'agencement de fibres textiles (cf. § I.3.2). Il faut donc garder à l'esprit que les propriétés mécaniques finales de cette matrice découleront non seulement de la nature chimique du matériau constitutif mais aussi de la mise en forme de ce matériau. Dans notre cas, la structure textile envisagée devrait permettre de moduler une partie des propriétés mécaniques et tout particulièrement le module d'Young E , la déformation à la limite d'élasticité ϵ_y ainsi que la déformation de rupture ϵ_r .

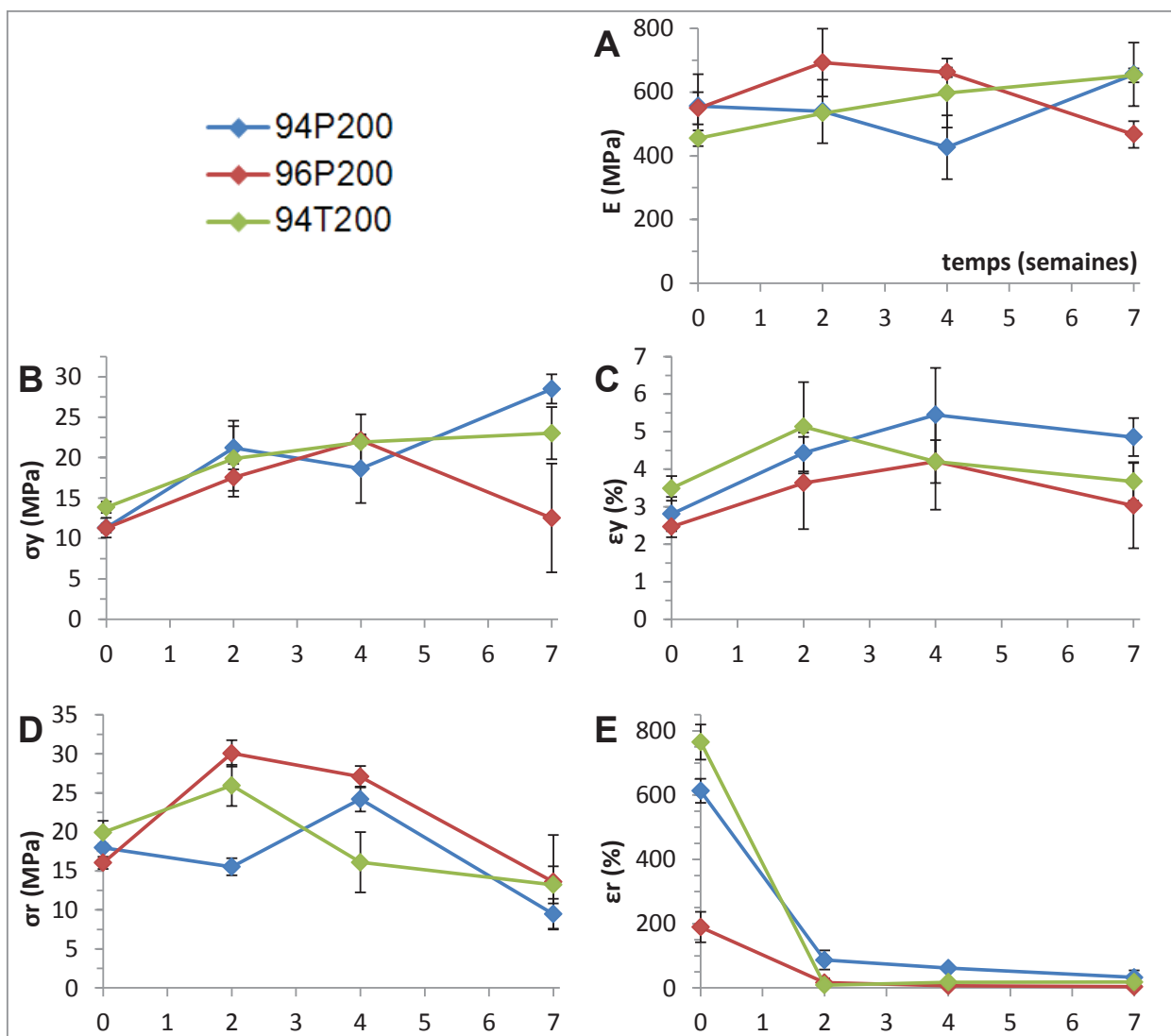


Figure III-11 : Evolution des propriétés mécaniques des copolymères pendant la dégradation : module d'Young E (A), limite d'élasticité σ_y (B), déformation à la limite d'élasticité ϵ_y (C), contrainte de rupture σ_r (D), déformation de rupture ϵ_r (E)

Par ailleurs, il est important de mentionner que, dans le cadre d'une thèse CIFRE (fruit d'une collaboration entre notre laboratoire et une entreprise) menée parallèlement à celle-ci par Coline Pinese, un test supplémentaire de dégradation *in vivo* a été réalisé par implantation sous-cutanée d'échantillons sur des rats. Les résultats obtenus (non présentés ici), ont permis de confirmer notre sélection de polymères puisqu'une dégradation prématurée et très importante a été observée pour le 96P200. La forte cristallinité de ce polymère semble avoir eu un effet néfaste sur son comportement sous conditions physiologiques.

1.3. Conclusions

Les différentes expériences menées sur nos copolymères thermoplastiques ont permis d'affiner la sélection des formulations adaptées à notre cahier des charges. Dans un premier temps, l'étude préliminaire a rapidement mis en évidence la nécessité d'employer des copolymères à base de PLA hautement cristallin afin d'obtenir des propriétés mécaniques suffisantes. Après cette première étape, une seconde série de copolymères a été préparée et une étude plus approfondie reposant sur un test de dégradation *in vitro* a permis de réduire encore la sélection. Tous les résultats ont en effet montré que les échantillons de 100 kg/mol ne répondaient pas aux exigences du projet. Non seulement l'évolution de la prise d'eau, de la masse molaire et des propriétés mécaniques ont révélé une dégradation précoce par rapport aux polymères de 200 kg/mol, mais les analyses thermiques ont permis de déterminer des T_g trop proches de la température du corps humain pour les rendre envisageables pour le développement d'un substitut ligamentaire.

Les propriétés présentées par les copolymères de 200 kg/mol ont, au contraire, semblé intéressantes pour la suite du projet. Même si les résultats obtenus ne sont pas en parfaite adéquation avec les caractéristiques d'un LCA, la perspective de la mise en forme textile qui pourra être appliquée à ces polymères et la modulation des propriétés mécaniques qu'elle devrait générer nous permettent de considérer la suite du projet avec confiance. Les résultats obtenus lors des tests mécaniques et en particulier ceux concernant la limite élastique des copolymères nous ont toutefois poussés à considérer d'autres alternatives. La volonté de développer des polymères dégradables aux propriétés élastiques améliorées nous a rapidement conduits à nous intéresser aux élastomères réticulés chimiquement.

Notre laboratoire étant déjà impliqué dans des thématiques de réticulation par voie photochimique de polymères dégradables, nous nous sommes orientés vers la modification

chimique de polyesters aliphatiques classiques, le PLA et la PCL, avec, pour objectif final, le développement d'élastomères réticulés chimiquement, dégradables et biocompatibles. La section suivante traite du développement de ces élastomères dégradables via deux stratégies différentes : la voie nitrène et la voie thiol-yne.

2. Elastomères dégradables

2.1. Réticulation par voie nitrène

La première stratégie de réticulation envisagée pour le développement d'élastomères dégradables repose sur l'utilisation d'azotures. L'intérêt de cette espèce chimique photoréactive réside dans sa capacité à réagir avec des chaînes carbonées sous irradiation UV en s'insérant dans des liaisons X-H (X = C, N ou O). Cette réaction qui s'effectue via des mécanismes d'insertion (voie **a**, minoritaire) et de recombinaison (voie **b**, majoritaire) de radicaux nitrène générés par l'irradiation [268-270] permet de s'affranchir des limitations liées à la faible réactivité des chaînes polyesters aliphatiques comme le PLA. Cette voie de synthèse est cependant confrontée à de nombreuses réactions secondaires parasites (**Figure III-12**).

En appliquant une irradiation UV à des composés porteurs de plusieurs fonctions azoture, il est donc théoriquement possible de générer plusieurs radicaux nitrène pouvant réagir sur plusieurs chaînes du polymère. Il se créerait ainsi des pontages entre ces chaînes, ce qui aboutirait à une réticulation de la matrice polymère. Le schéma réactionnel présenté (**Figure III-13**) montre l'exemple d'un pontage entre deux chaînes de polymère. Dans le cas d'un polyazoture de fonctionnalité supérieure à 2, la réaction peut se poursuivre avec les autres fonctions azotures sur d'autres atomes de carbone d'une chaîne du polymère.

Nous avons donc cherché à provoquer une réticulation du PLA en employant des molécules dotées de plusieurs fonctions azoture pouvant générer des ponts de réticulation. Cette stratégie a été décrite dans la littérature sur un autre polyester dégradable, le PHB-co-PHV, avec un agent de réticulation difonctionnel court, la 2,6-bis(4-azidobenzylidène)-4-méthylcyclohexanone (BA) [271]. Cette étude menée pour le développement d'une résine utilisée pour la photolithographie a montré que cet azoture, utilisé à une concentration relativement faible (3 %_{wt}), permettait effectivement d'obtenir une structure réticulée chimiquement à partir de films fins obtenus par *spin-coating*.

Notre objectif a consisté en l'extrapolation de ce procédé en recourant à différents agents de réticulation polyazidés afin de développer un PLA réticulé aux propriétés élastiques améliorées. Ce projet a été divisé en deux parties : la synthèse des agents de réticulation qui sont venus s'ajouter au BA disponible commercialement puis les tentatives de réticulation à partir de ces différents composés.

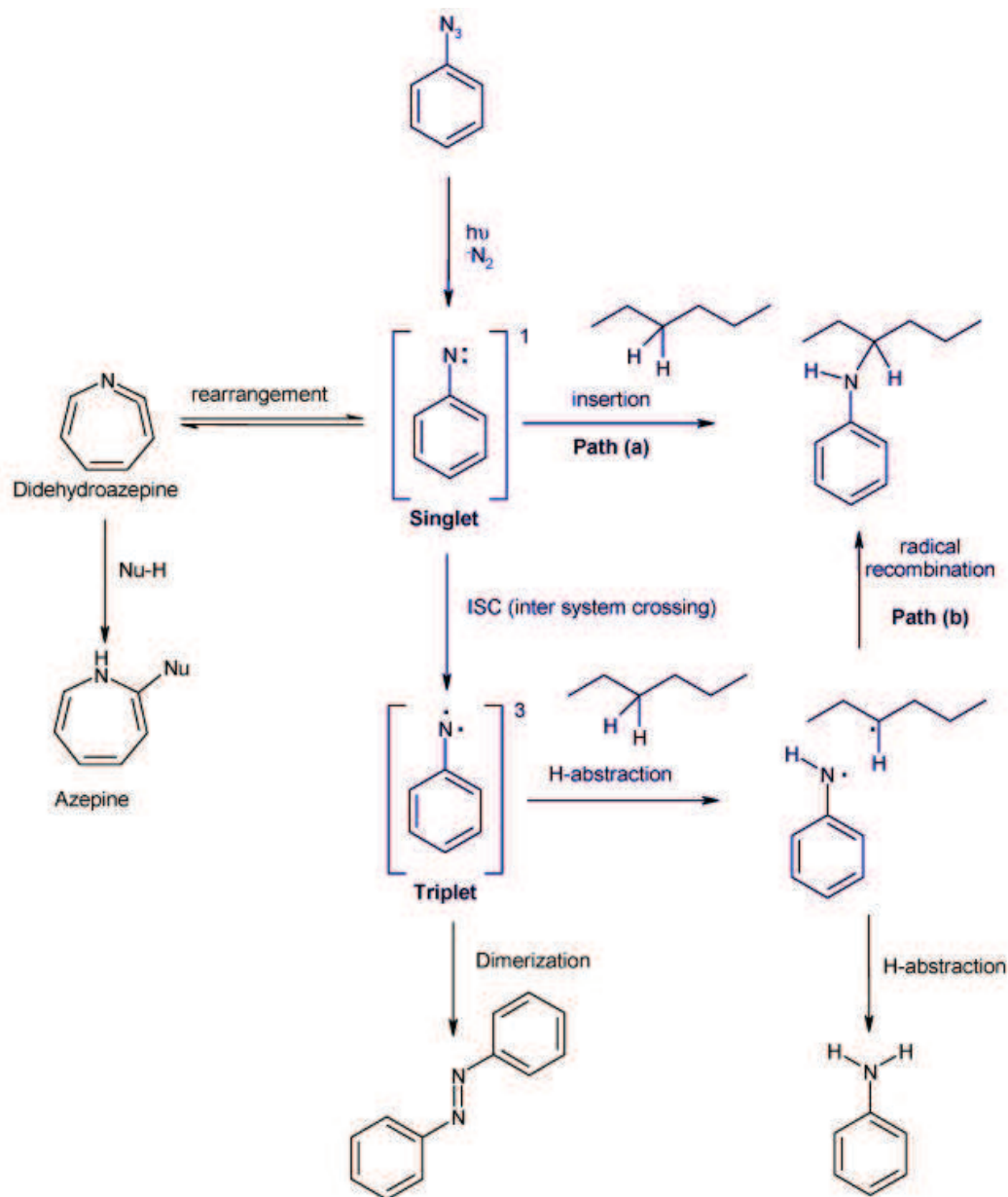


Figure III-12 : Réactivité photochimique des azotures de phényle [268]

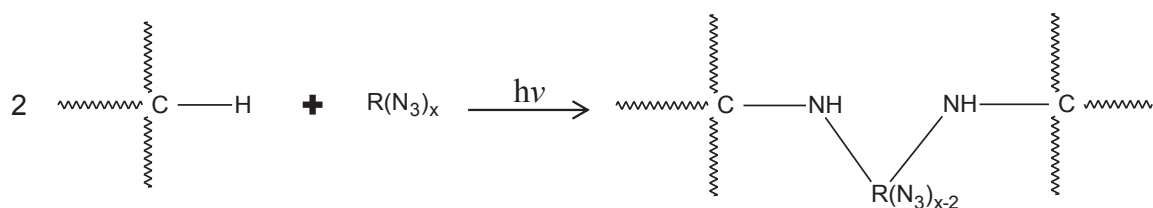


Figure III-13 : Schéma réactionnel de la réticulation de chaînes polyesters par un polyazoture

2.1.1. Synthèse des agents de réticulation

Afin d'élargir la palette d'agents de réticulation polyazidés disponibles, nous avons réalisé plusieurs réactions d'estérification à partir de l'acide azidobenzoïque et de polyols. Dans un premier temps, des essais ont permis de montrer qu'il était possible de greffer une molécule relativement proche, l'acide benzoïque, sur un triol, le glycérol, grâce à une réaction d'estérification catalysée par de l'acide paratoluènesulfonique (APTS). Cette réaction a ensuite à nouveau été appliquée au glycérol avec l'acide azidobenzoïque. Le greffage a pu être mis en évidence grâce aux analyses IRTF de l'acide et du produit final (**Figure III-14**) et au décalage du pic caractéristique de la liaison C=O d'un acide carboxylique (1678 cm^{-1}) vers celui caractéristique de la liaison ester correspondante (1720 cm^{-1}).

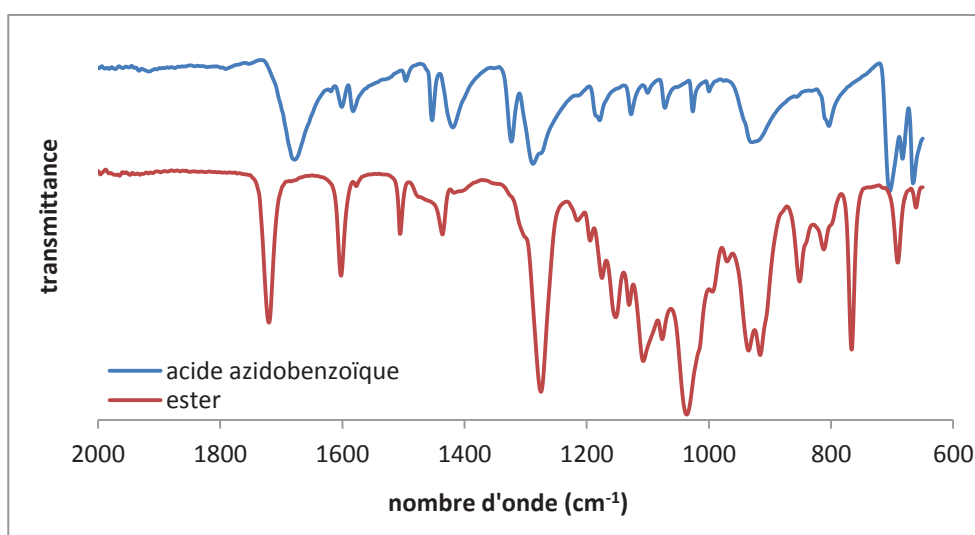


Figure III-14 : Spectres IRTF de l'acide azidobenzoïque et de l'ester formé avec le glycérol

En revanche, cette estérification catalysée par l'APTS a été appliquée à d'autres polyols (PEG triol, Tetronic 1107 ou Tetronic 90R4 par exemple) mais sans succès. Les doutes quant à l'efficacité et à la reproductibilité de cette voie de synthèse nous ont donc poussés à nous orienter vers la seconde méthode de greffage de l'acide azidobenzoïque dite estérification DCC / DMAP. Cette seconde méthode d'estérification a été appliquée au Pluronic F127 et au Tetronic 1107 et son efficacité a pu être démontrée grâce aux analyses RMN et notamment grâce à l'apparition à 8,1 et 7,1 ppm des pics des protons aromatiques présents sur l'acide azidobenzoïque (**Figure III-15**). La réalisation d'analyses DOSY a confirmé ce résultat en révélant que ces deux pics étaient associés au même coefficient de diffusion que les pics PEG et PPG du copolymère (**Figure III-16**).

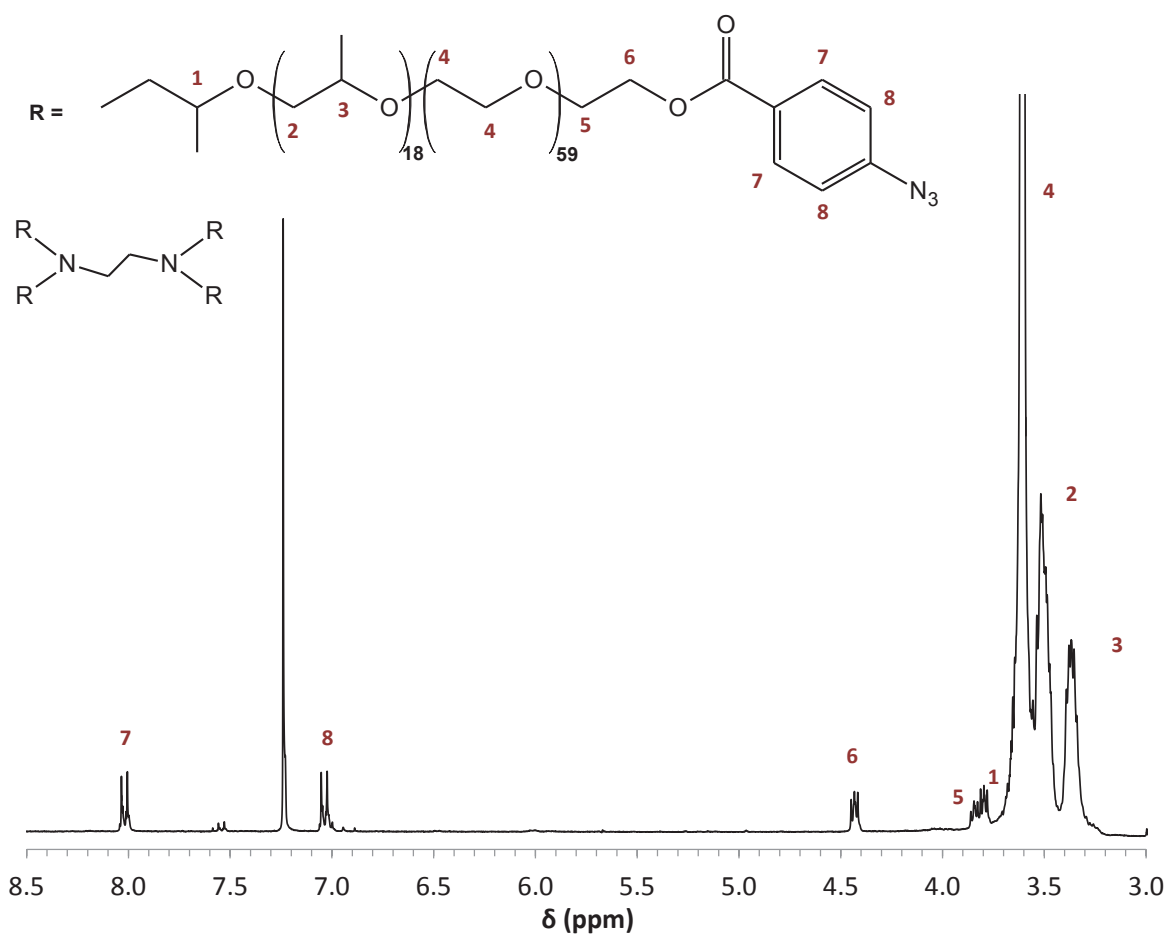


Figure III-15 : Spectre RMN ^1H du Tetronic azidé

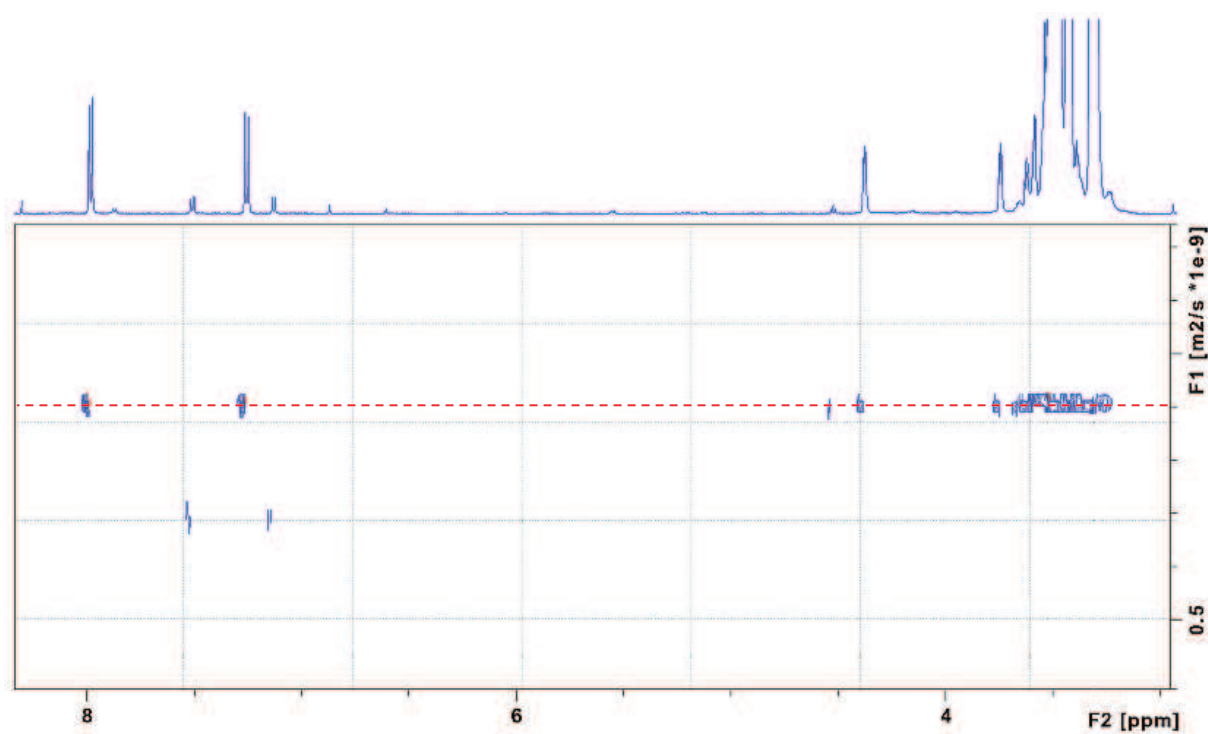


Figure III-16 : Spectre DOSY du Tetronic azidé

L'intégration des pics des spectres RMN obtenus ont permis de calculer, que ce soit avec le Pluronic azidé (PA) ou avec le Tetronic azidé (TA), des taux de substitution supérieurs à 100 %. Cette incohérence serait *a priori* due à la présence connue dans les produits commerciaux comme le Pluronic et le Tetronic de chaînes d'homopolymères de PEG ou de PPG issues de leur synthèse. Ce phénomène a été confirmé par les analyses GPC effectuées sur le Pluronic et le Tetronic non modifiés (**Figure III-17**). Les chromatogrammes ont en effet révélé la bimodalité de ces produits indiquant la présence de deux espèces de masses molaires différentes dans chacun de ces deux produits commerciaux. Ces homopolymères, plus courts que les copolymères à blocs que sont le poloxamère et la poloxamine, fausseraient légèrement les intégrations mesurées et donneraient ainsi des valeurs de taux de substitution surestimées. Etant donné la faible intensité des pics visibles sur les chromatogrammes et correspondant à ces homopolymères, on peut cependant raisonnablement considérer que les taux de substitution réels étaient très proches de 100 %.

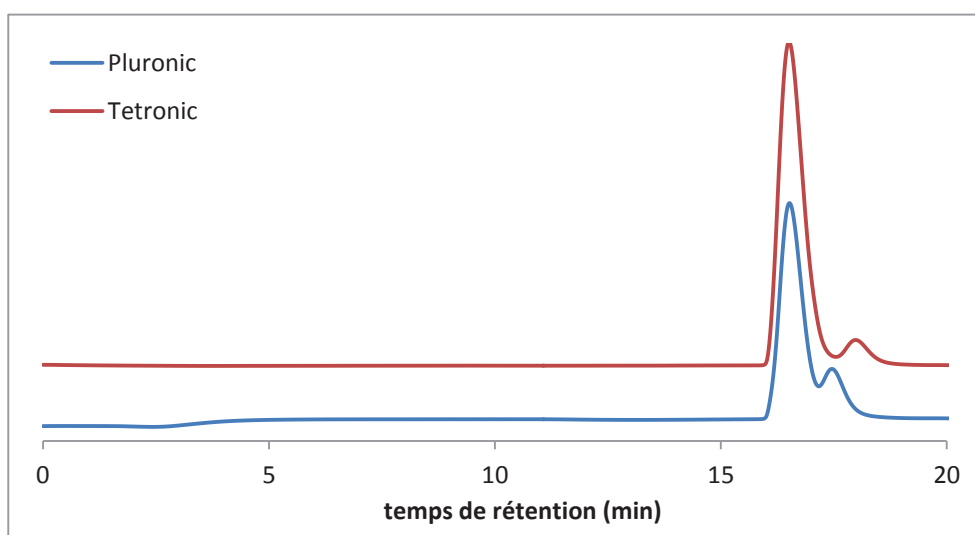


Figure III-17 : Chromatogrammes GPC du Pluronic et du Tetronic

En conclusion, les différentes méthodes d'estérification employées nous ont permis de disposer d'une large palette d'agents de réticulation polyazidés. Au BA (diazoture commercial court) se sont ajoutés le glycérol azidé (triazoture court), le PA (diazoture long) ainsi que le TA (tétraazoture long).

2.1.2. Réticulation

Des essais de réticulation ont pu être menés grâce aux quatre agents de réticulations à disposition. Là encore, deux approches ont été envisagées. Dans un premier temps, seuls les agents de réticulation courts ont été utilisés avec pour objectif la réticulation et l'amélioration des propriétés mécaniques des copolymères à blocs thermoplastiques décrits et étudiés précédemment (cf. § III.1). Pour mener ces essais, ces deux agents de réticulation ont été incorporés dans des copolymères de la série T100 de manière à ce que chaque mélange contienne une fonction azoture pour cent motifs de PLA ($1\%_{\text{mol}}$). Cette concentration a été choisie par rapport aux données de la littérature [271] qui suggérait qu'une réticulation optimale était obtenue avec le BA et un copolymère PHB-co-PHV dès $0,72\%_{\text{mol}}$ de concentration en réticulant.

Des films ont été préparés à partir de ces mélanges par évaporation de solvant et ont été exposés à une irradiation UV. Pour chacun de ces films, une disparition de la bande caractéristique du groupe azoture a été observée par IRTF (2101 cm^{-1}) suite à l'irradiation. Malgré cela, tous étaient complètement solubles dans le DCM, ce qui indiquerait l'absence ou la faiblesse de réticulation des matrices polymères. Des analyses GPC à double détection réfractométrique (RI) et UV réalisées sur ces mélanges polymère-réticulant (**Figure III-18**) ont pourtant révélé des pics détectés simultanément en RI (pic du polymère) et en UV (à une longueur d'onde caractéristique de l'agent de réticulation).

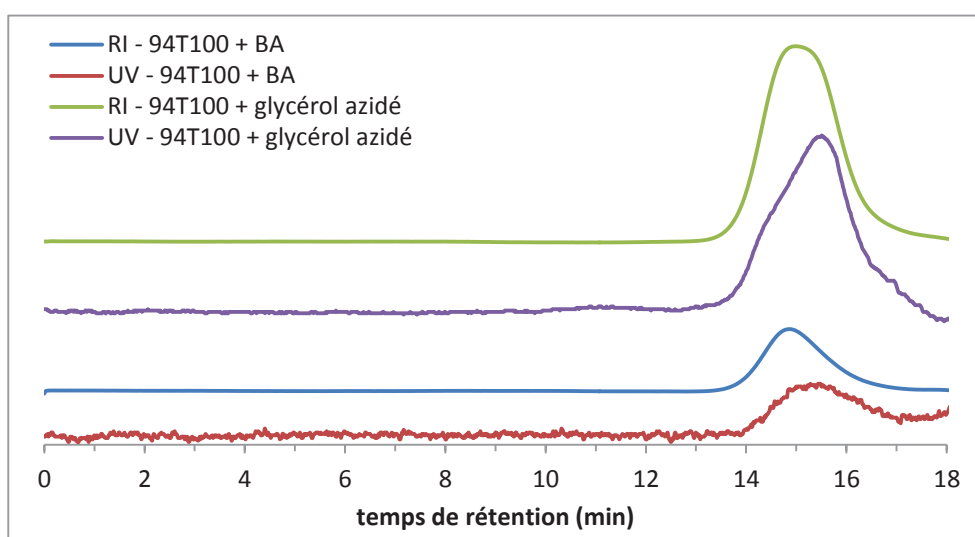


Figure III-18 : Chromatogrammes GPC des mélanges polymère-réticulant après irradiation UV

Ce résultat indique que le polymère était bien porteur de l'espèce chimique détectable en UV, c'est-à-dire l'agent de réticulation. Tous les résultats portent donc à penser que l'irradiation a bien provoqué la réaction photochimique des azotures, mais que cette réaction n'a été que partiellement efficace et n'a donné lieu qu'au monogreffage des agents diazidés sans engendrer de réticulation.

L'absence de réticulation lors de ces premières expériences pourrait s'expliquer par la nature des agents de réticulation employés. Il se pourrait en effet que ces deux produits soient i) dotés de trop peu de fonctions azoture pour engendrer un véritable réseau réticulé tridimensionnel, ou ii) trop courts, ce qui limiterait l'accessibilité simultanée de plusieurs groupes réactifs à différentes chaînes polymère. C'est pourquoi une seconde stratégie de réticulation par voie nitrène a été mise au point. Celle-ci repose sur la synthèse par greffage de l'acide azidobenzoïque d'agents de réticulation longs à partir du Pluronic et du Tetronic (respectivement PA et TA) et sur leur incorporation, non plus dans des matrices de copolymères, mais dans des homopolymères de PLA.

L'un des intérêts pour nous de cette stratégie est de pouvoir synthétiser, à partir de blocs PLA et de Pluronic ou de Tetronic, une structure réticulée d'une composition chimique quasiment identique à celle des copolymères thermoplastiques étudiés précédemment (**Figure III-19**).

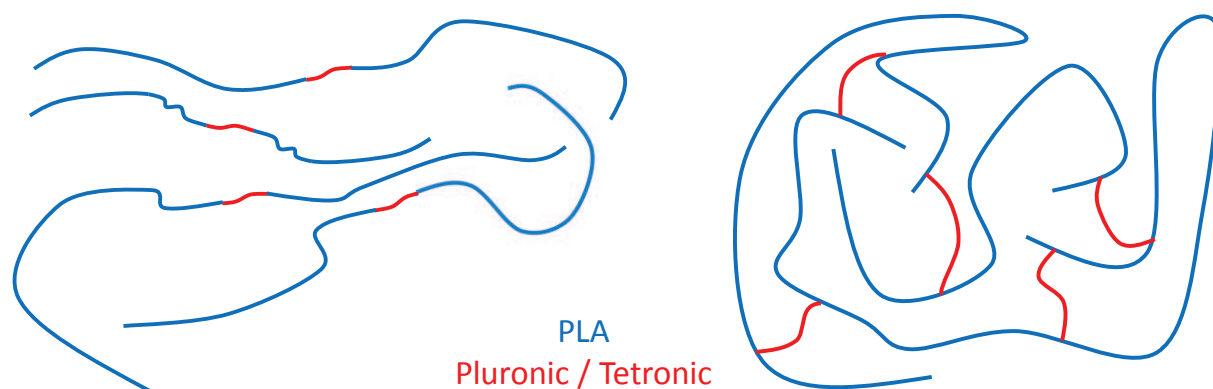


Figure III-19 : Structure chimique des copolymères thermoplastiques (à gauche) et des copolymères réticulés (à droite)

Des films ont donc à nouveau été préparés par évaporation de solvant en employant le PA et le TA comme agents de réticulation et des homopolymères de PLA₉₄ et PLA₉₆ (masses molaires de 200 kg/mol) comme matrices polymères. Etant donné l'importante masse molaire de ces agents de réticulation, il n'a pas été possible de travailler avec les mêmes concentrations en fonction azoture que précédemment. L'étude a donc été menée en faisant varier la concentration de réticulant dans le milieu. Un premier constat a pu être fait visuellement lors de l'irradiation UV des différents échantillons. Tous ont en effet montré un important changement de couleur : les films initialement incolores à blanchâtres, ont rapidement pris une teinte orange à brune sous l'effet du rayonnement UV (*Figure III-20*), ce qui est le signe de la formation de radicaux nitrène et, a priori, un signe indirect de la réaction de réticulation.



Figure III-20 : Films PLA + TA avant et après irradiation UV

Contrairement aux essais de réticulation réalisés avec les agents courts, les échantillons préparés avec le PA et le TA et irradiés ont montré, lors de leur immersion dans du DCM, une insolubilité partielle. Cette insolubilité suggère qu'il y a cette fois bel et bien eu une réticulation du polymère. Les fractions insolubles ont ensuite été récupérées, séchées puis pesées, ce qui a permis de déterminer la fraction de gel, c'est-à-dire la proportion de matière réticulée (*Figure III-21*). Tandis qu'avec le PA, la fraction de gel maximale obtenue s'élevait à 10%, les meilleurs résultats réalisés avec le TA atteignaient près de 30% de réticulation. Ces résultats montrent bien l'importance de la fonctionnalité de l'agent de réticulation employé et du nombre de fonctions réactives dont il est porteur, même si le lien semble complexe (multiplier la fonctionnalité par deux a multiplié la réticulation par trois).

Au vu des résultats obtenus, une attention particulière a été portée au TA qui a conduit à une réticulation maximale. La mesure des fractions de gel a montré une augmentation presque linéaire de la réticulation du polymère en fonction de la quantité de TA dans le milieu

réactionnel. A partir de 40%_{wt} de TA, cette augmentation ralentit et la réticulation semble même atteindre un palier compris entre 23 et 28% de réticulation. L'existence d'un plafond de la réticulation à partir de 40 ou 50%_{wt} pourrait être liée à la transition dans la composition du milieu réactionnel, puisqu'à partir de ces concentrations, le mélange commence à contenir plus d'agent de réticulation que de matrice PLA.

Par ailleurs, la littérature [268] suggère qu'en raison de la nature en deux étapes de la réaction chimique entre un radical nitrène et une matrice polymère (formation d'un macroradical sur la chaîne polymère puis recombinaison), la probabilité que le greffage ait lieu soit proportionnelle au temps de contact entre les deux radicaux et serait, par conséquent, liée à la mobilité des réactifs et notamment à celle des chaînes du polymère. Autrement dit, le greffage devrait être d'autant plus favorisé que le polymère serait cristallin et ses chaînes peu mobiles. Malgré cela, il n'y a pas eu de différence significative de réticulation entre le PLA₉₄ et le PLA₉₆, la différence de cristallinité semblant insuffisante pour induire une variation importante de la mobilité des chaînes.

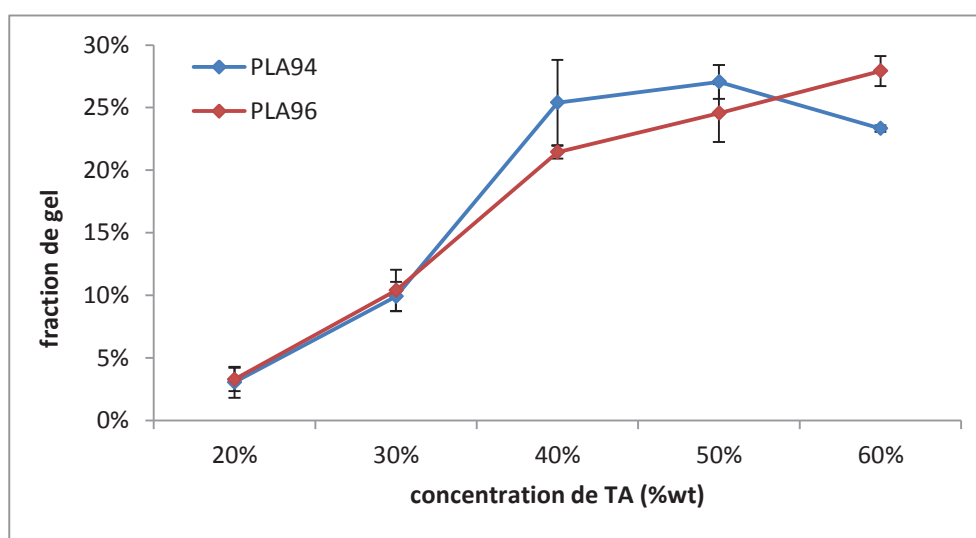


Figure III-21 : Réticulation des PLA en fonction de la concentration en réticulant TA

A l'issue de ces essais de réticulation, certains échantillons n'ont pas été conservés pour la suite de l'étude : les mélanges contenant 20 et 60%_{wt} de réticulant. Ils ont été éliminés, dans le premier cas, en raison des faibles résultats obtenus (3% de réticulation), et, dans le second, d'une part parce que le palier de réticulation semblait atteint, et, d'autre part, parce la composition (plus d'agent réticulant macromoléculaire PA ou TA que de matrice polymère) n'était pas cohérente avec notre volonté d'avoir une composition proche de celle des copolymères thermoplastiques décrits précédemment.

Les échantillons sélectionnés ont quant à eux été soumis à une étude plus approfondie. Dans la mesure où la réticulation d'un polymère est supposée avoir un certain nombre de conséquences sur sa structure et ses propriétés thermiques, notamment une diminution de la cristallinité et une augmentation de la T_g , les différents mélanges irradiés et réticulés ont été analysés par DSC.

Malgré l'insolubilité observée et les taux de réticulation non négligeables qui ont été calculés, l'impact de l'irradiation sur les propriétés thermiques a été relativement faible. Aucune modification concernant la transition vitreuse n'a par exemple été détectée. Le seul changement significatif observé a concerné la fusion des blocs PLA du mélange réticulé. Les résultats présentés dans la **Figure III-22** montrent en effet que l'enthalpie de fusion des blocs PLA irradiés en présence de TA était inférieure à celle de blocs PLA irradiés en présence de Tetronic non modifié (expérience contrôle). Ce constat est valable quel que soit le PLA utilisé et quelle que soit la concentration en Tetronic. Cette diminution d'enthalpie peut être imputée à la réaction de réticulation qui, en liant les chaînes de polymère entre elles, limite leur mobilité et s'oppose ainsi à la cristallisation.

En revanche, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre compte tenu de l'augmentation de la réticulation avec la concentration de TA, aucune diminution de l'enthalpie de fusion du PLA n'a été notée. Malgré les résultats précédents, cela traduit donc une faible réticulation du PLA.

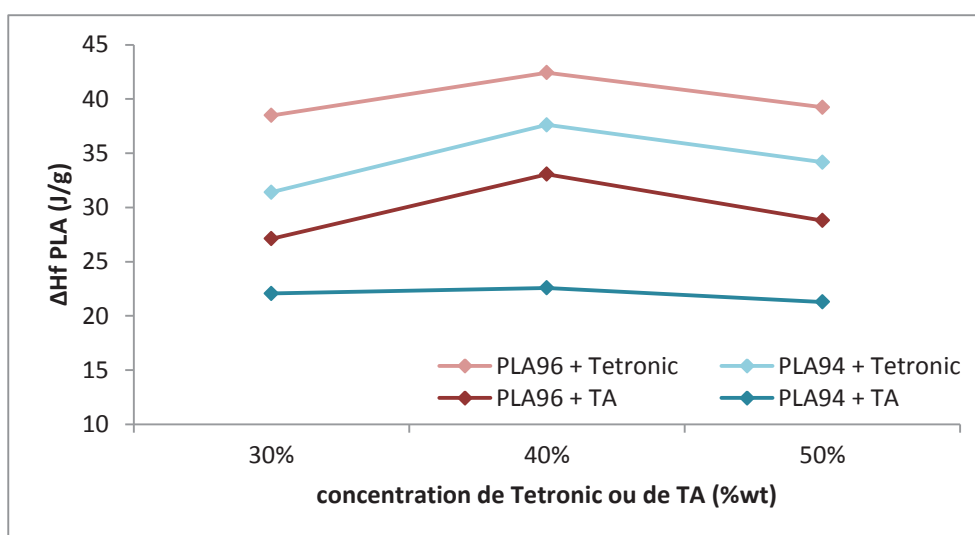


Figure III-22 : Enthalpie de fusion du PLA en fonction de la concentration en Tetronic ou TA

L'objectif principal de la réticulation du PLA étant l'amélioration de ses propriétés élastiques, la suite de l'étude a consisté à évaluer les propriétés mécaniques des différents films réticulés en traction. Malheureusement, aucune amélioration notable due à la réticulation n'a été observée.

L'une des rares différences positives constatées entre les films préparés à partir de PLA et d'agent de réticulation TA avec et sans irradiation UV l'a été sur les déformations à la limite d'élasticité ϵ_y (**Figure III-23**). Cette déformation qui caractérise le domaine élastique d'un matériau a en effet subi une légère augmentation (par exemple avec 40 % de TA, de 3,1 à 4,8 % pour le PLA₉₆ et de 3,0 à 3,8 % pour le PLA₉₄) après l'exposition au rayonnement UV et par conséquent après réticulation. Compte tenu de la faiblesse de cette augmentation et de l'importance des écarts types, il est cependant difficile de considérer cette évolution comme significative. Il n'y a par ailleurs pas eu d'amélioration notable par rapport aux copolymères thermoplastiques de 200 kg/mol étudiés plus tôt (cf. § III.1.2.5 et **Annexe 2**).

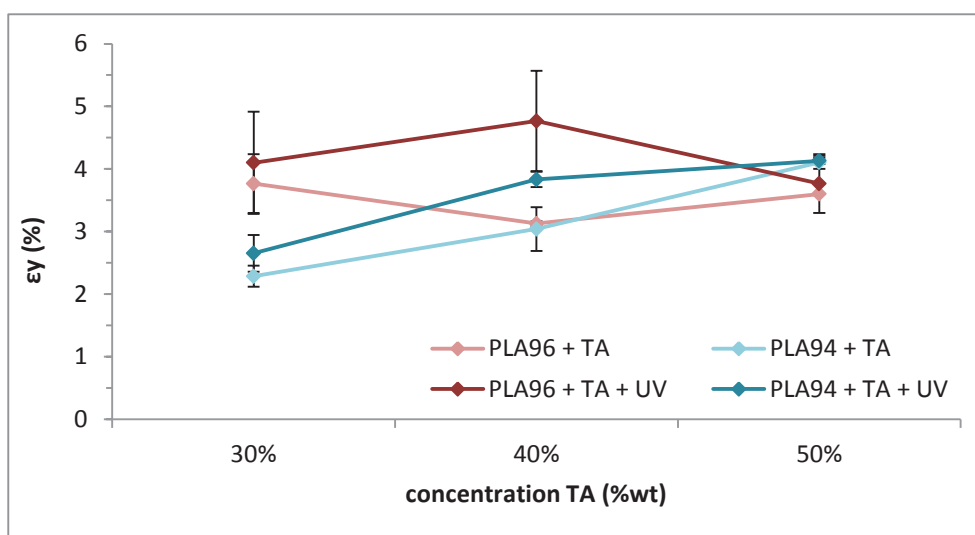


Figure III-23 : Déformation à la limite d'élasticité ϵ_y des films PLA + TA avant et après irradiation

En conclusion, nous sommes parvenus à améliorer et optimiser la réticulation du PLA en utilisant des agents de réticulation polyazidés longs. Les fractions de gel mesurées et la quasi-absence d'évolution des propriétés thermiques et mécaniques sont toutefois en contradiction avec les résultats présentés dans la littérature [271] décrivant des copolymères PHB-co-PHV réticulés à près de 90% grâce au diazoture court BA.

La réalisation d'expériences complémentaires comparant l'efficacité de la réticulation du PLA et de PHB-co-PHV nous a permis de formuler plusieurs hypothèses sur les différences entre ces deux polymères. La première différence entre ces deux polymères réside dans leur aspect. Les films de PLA présentaient en effet une opacité plus importante que les PHB-co-PHV, or on peut supposer que l'efficacité de la réaction de réticulation est directement liée à l'exposition au rayonnement UV et par conséquent à la profondeur de pénétration de ce rayonnement dans la matrice polymère. L'opacité du PLA peut donc expliquer en partie la diminution de la réticulation par rapport au PHB-co-PHV. Des expériences menées avec un appareillage différent ont montré qu'une augmentation de la puissance de la lampe UV utilisée pour l'irradiation (120 W/cm^2 au lieu de 75 mW/cm^2) pouvait compenser, au moins partiellement, l'opacité de la matrice polymère puisque des fractions de gel allant jusqu'à 15 % avec des mélanges PLA et BA et 35 % avec des mélanges PLA et TA ont pu être obtenues.

Concernant le cas particulier du BA, une hétérogénéité des films formés par évaporation de solvant a parfois été constatée avec le PLA mais jamais avec le PHB-co-PHV. Un manque de miscibilité entre le BA et le PLA pourrait être à l'origine d'un phénomène de ségrégation de phases limitant l'insertion de l'agent de réticulation au sein de la matrice polymère, ce qui pourrait également expliquer l'absence de réticulation. Enfin, la nature chimique du polymère utilisé doit évidemment jouer un rôle très important dans la réaction de réticulation. Certains travaux suggèrent notamment que la cristallinité du polymère aurait une grande influence sur cette réaction [268]. Le fait que le PHB-co-PHV soit un polymère très cristallin semble étayer cette dernière hypothèse [272].

En conclusion, bien que la stratégie de réticulation par voie nitrène nous ait permis de développer des structures partiellement réticulées proches des copolymères thermoplastiques en termes de composition chimique, la réaction initiée par l'irradiation UV n'a pas eu les effets escomptés sur les propriétés mécaniques. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers deuxième voie de synthèse d'élastomères réticulés chimiquement reposant sur une stratégie de réticulation différente.

2.2. Réticulation par voie thiol-yne

La seconde stratégie de réticulation envisagée repose également sur une volonté de développer une méthode de synthèse simple et rapide s'appuyant notamment sur une réaction de réticulation par voie photochimique. Si l'objectif de la réticulation par voie nitrène était de mettre à profit la réactivité des azotures pour pallier l'absence de fonctions réactives sur les chaînes de PLA, le but de la voie thiol-yne est, au contraire, d'apporter, par le biais d'une modification chimique, une fonctionnalité à un autre polyester aliphatique, la PCL.

Une méthode de modification chimique de polyesters aliphatiques et plus particulièrement de la PCL par voie anionique a été mise au point et largement étudiée au sein de notre laboratoire [273-275]. Cette méthode consiste à activer le polymère, et plus précisément l'hydrogène situé en α de la fonction ester, par voie anionique. Cette activation, réalisée à l'aide d'une base forte, le diisopropylamidure de lithium (LDA), aboutit à la formation d'un carbanion sur une partie des motifs caprolactone de la PCL. Cette PCL anionique peut alors être employée comme agent nucléophile et intervenir dans des réactions de substitution et ainsi mener à la formation d'une PCL partiellement fonctionnalisée (classiquement autour de 10 %) avec divers groupes substituants (**Figure III-24**).

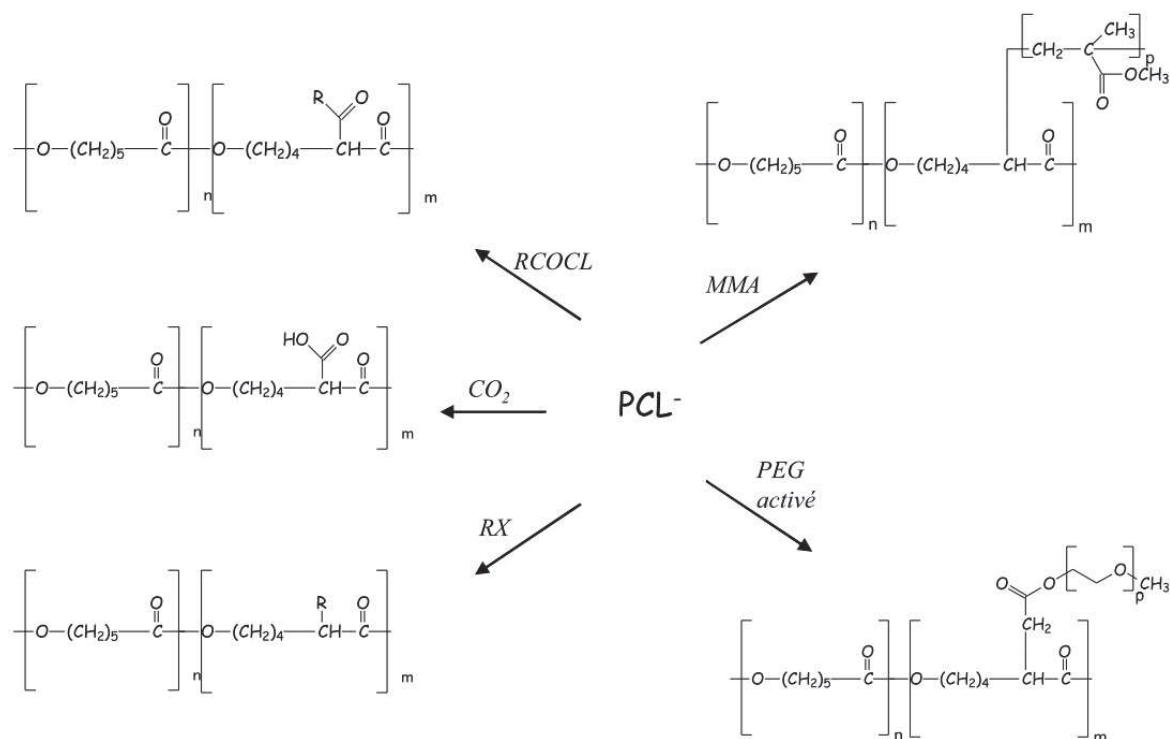


Figure III-24 : Modification anionique de la PCL avec divers groupes substituants [276]

Dans notre cas, l'objectif a été de greffer sur la PCL un groupement chimique susceptible de réagir, à nouveau sous l'effet d'une irradiation UV, avec une autre molécule polyfonctionnelle qui jouerait le rôle d'agent de réticulation. Le choix du substituant s'est porté sur le bromure de propargyle, porteur d'une fonction alcyne (**Figure III-25**).

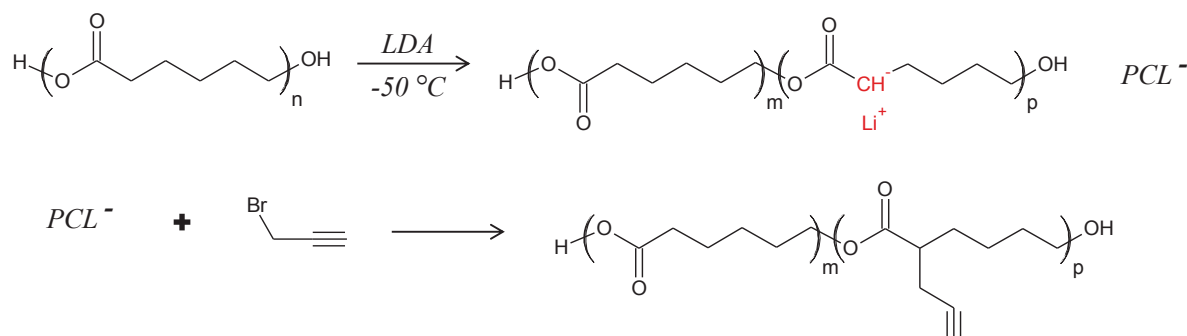


Figure III-25 : Schéma réactionnel de la propargylation de la PCL

Grâce à l'apport de cet alcyne, il est possible de réaliser une réaction de type thiol-yne, qui relève par ailleurs du domaine de la "chimie click". Il s'agit d'une réaction d'addition survenant entre un thiol et un alcyne et qui est activée par irradiation UV et éventuellement aidée par l'ajout de photoamorceurs générateurs de radicaux parmi lesquels on compte certains des produits de la famille des Irgacure[®] [277].

La stratégie de réticulation par voie thiol-yne s'est donc déroulée en deux étapes. La première a consisté à mettre au point la méthode de synthèse d'une PCL porteuse de fonctions alcyne par greffage du bromure de propargyle (ou bromopropyne). La seconde étape a ensuite été consacrée à l'optimisation de la réticulation de cette PCL dite propargylée grâce au pentaérythritol tetrakis-(3 mercaptopropionate) (PETMP), un tétrathiol commercial employé ici comme agent de réticulation.

L'irradiation UV et le photoamorceur éventuellement présent provoquent une réaction entre les thiols de l'agent de réticulation et les alcynes de la PCL propargylée. Le PETMP étant tétrafonctionnel et chaque alcyne étant théoriquement capable de réagir avec deux thiols [277], on devrait alors assister à la création de ponts de réticulation entre plusieurs chaînes macromoléculaires de la PCL propargylée et ainsi obtenir une fraction réticulée du polymère (**Figure III-26**).

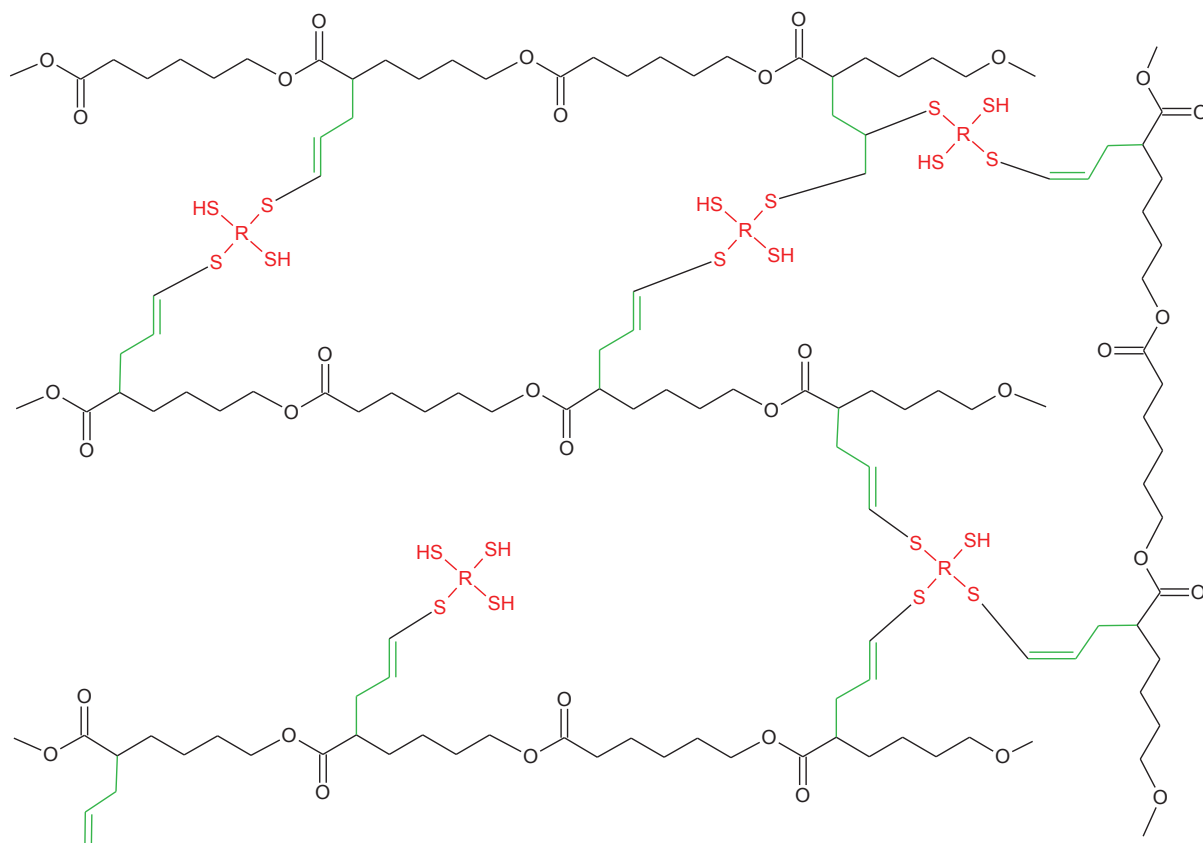


Figure III–26 : Réticulation de la PCL propargylée par le PETMP

2.2.1. Synthèse de la PCL propargylée

L'influence de plusieurs paramètres de synthèse a été évaluée. Cette évaluation a été faite d'une part en déterminant grâce aux analyses RMN les taux de substitution obtenus (c'est-à-dire l'efficacité de la propargylation), et, d'autre part, en étudiant les conséquences de la synthèse sur les masses molaires finales des PCL modifiées. L'une des difficultés de cette voie de synthèse est en effet de trouver un compromis entre taux de substitution et masse molaire des chaînes substituées. En effet, en raison de l'existence de réactions secondaires de scissions de chaînes, une diminution de la masse molaire du polymère est généralement observée lors de l'activation anionique.

La vérification du greffage du propargyle, autrement dit de l'efficacité de la réaction, a été effectuée grâce aux analyses RMN (**Figure III–27**). Le greffage s'est en effet accompagné de l'apparition de pics caractéristiques du groupement propargyle à 2,5 ppm (proton méthylénique **5**) et 2,0 ppm (proton alcyne **6**). C'est ce pic à 2,0 ppm, mieux défini que celui à 2,5 ppm, qui a été utilisé afin de déterminer les taux de substitution.

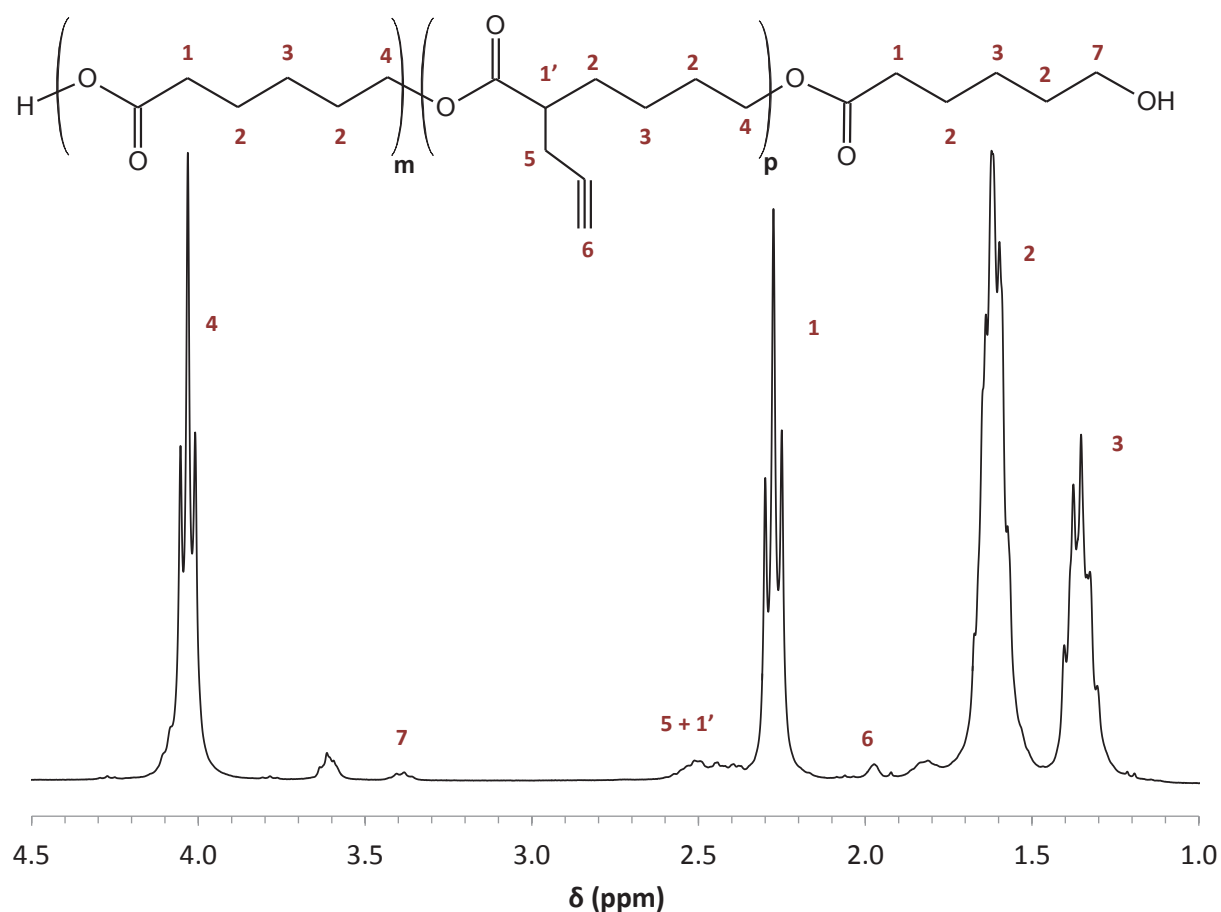


Figure III-27 : Spectre RMN ^1H de la PCL propargylée

Il est par ailleurs important de s'intéresser au pic à 3,4 ppm. En effet, il a été observé au cours des différentes expériences que l'intensité de ce pic caractérisant les protons situés en α de l'alcool terminal a nettement augmenté après chaque propargylation de la PCL. Cette augmentation traduit donc celle du nombre d'extrémités de chaînes de PCL, c'est-à-dire un raccourcissement de ces chaînes. Ce phénomène de scission de chaînes causé par l'étape d'activation anionique évoqué plus tôt constitue le second critère d'évaluation de la propargylation.

Dans la mesure où la modification de la PCL est effectuée dans l'optique d'une amélioration de ses propriétés mécaniques et d'une application en tant que matériau, il est évident que ce phénomène de scission de chaînes peut constituer un facteur limitant. C'est pourquoi des analyses GPC ont été effectuées sur toutes les PCL propargylées.

Les chromatogrammes obtenus (**Figure III–28**) ont systématiquement révélé une augmentation du temps de rétention après propargylation, confirmant ainsi la diminution de la masse molaire causée par la réaction. On peut constater que cela a été accompagné par un élargissement du pic (et une augmentation de la dispersité) ainsi que de l'apparition sur le pic d'un épaulement, voire dans certains cas d'une bimodalité qui traduirait l'existence d'une double population au sein du produit. Une hypothèse a été proposée pour expliquer cette double population. L'apparition d'une coloration blanche lorsque la solution de PCL dissoute dans le THF est refroidie à -50°C suggérerait en effet une diminution de la solubilité de la PCL. On pourrait donc envisager que le milieu réactionnel soit constitué en partie de la PCL en solution mais aussi de PCL précipitée sur laquelle la réaction chimique ne pourrait alors pas avoir lieu et ne serait ni substituée, ni hydrolysée.

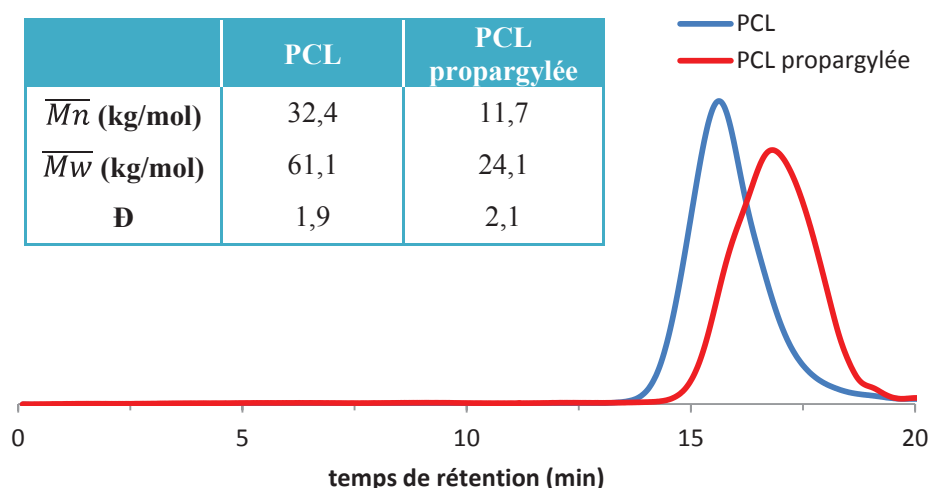


Figure III–28 : Chromatogrammes et propriétés mesurées par GPC de la PCL et de la PCL propargylée

Cette hypothèse a été étayée par des analyses DOSY réalisées sur des PCL propargylées et révélant des traces de diffusion allongées pour la majorité des pics (existence de l'espèce sous plusieurs masses molaires) tandis que celle du pic à 2,4 ppm attribué au CH_2 du propargyle (le pic à 2,5 ppm étant ici celui du DMSO, solvant de l'analyse) est plus courte, indiquant une unité de population de la PCL portant le motif propargyle (**Figure III–29**).

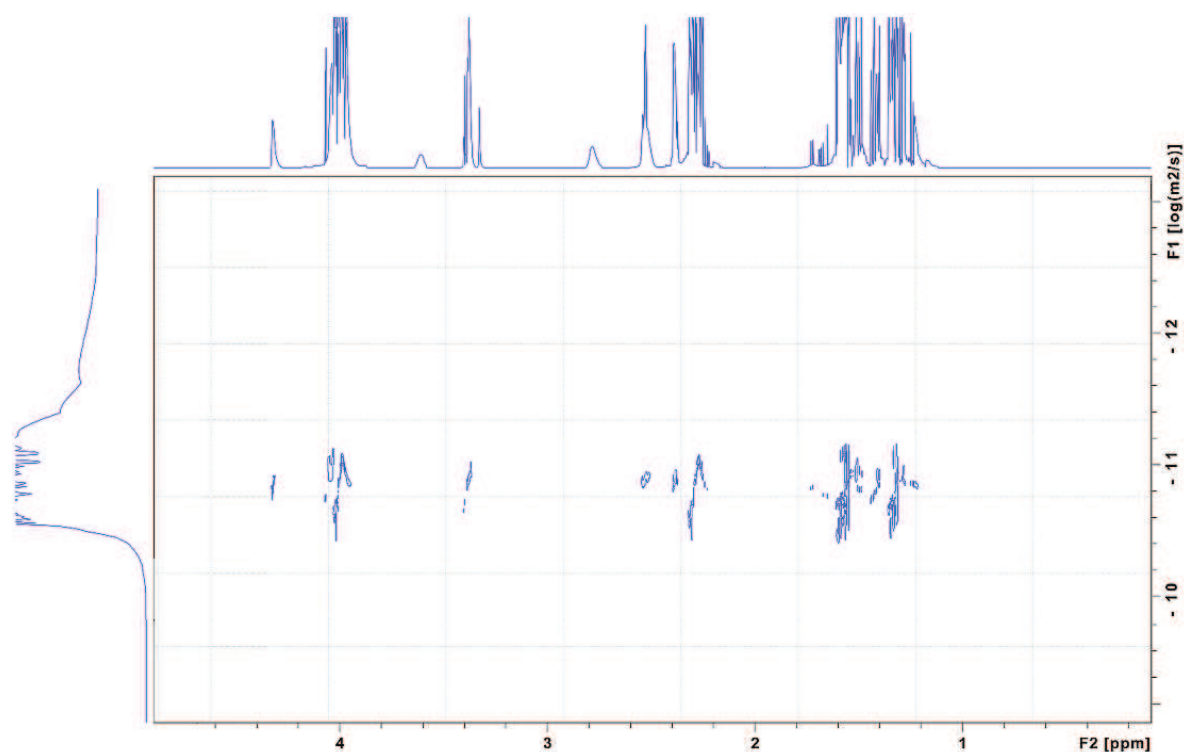


Figure III-29 : Spectre DOSY de la PCL propargylée

C'est donc sur la base de ces deux critères qu'ont été évaluées les différentes synthèses effectuées. Dans un premier temps, une comparaison a été réalisée entre les deux systèmes de refroidissement : le bain éthanol-azote et le cryostat à éthanol. L'utilisation du cryostat associé à un réacteur à double-enveloppe peut paraître plus appropriée dans la mesure où ce système permet non seulement d'avoir un contrôle plus précis de la température du fluide mais aussi de la température du réacteur grâce à la circulation de ce fluide. Cette méthode est cependant limitée par la température minimale qu'il est possible d'atteindre (environ -40°C dans le réacteur) en raison des limites du cryostat et du réchauffement de l'éthanol dans le circuit de circulation. Cette limite s'est rapidement traduite par un contrôle moindre de la réaction, aussi bien sur la fonctionnalisation que sur la masse molaire finale du polymère.

La méthode employant le refroidissement avec un bain éthanol-azote a donc été la seule sélectionnée pour la production de PCL propargylée. Les quantités de LDA et de bromure de propargyle idéales ayant été déterminées au cours d'études préalables au sein du laboratoire, l'optimisation de la synthèse a été menée en travaillant sur les quantités de PCL et de solvant. Il est tout d'abord apparu qu'une concentration trop faible en polymère dans le milieu réactionnel (3g / 300 mL) limitait l'efficacité de la réaction de substitution.

Cela ne serait *a priori* pas lié à l'étape d'activation anionique puisqu'une diminution de la masse molaire a bien été observée, mais plutôt à la seconde étape de greffage. L'explication la plus plausible est qu'une concentration plus importante de PCL activée permet une réaction facilitée entre cette dernière et l'agent électrophile au détriment des éventuelles réactions secondaires pouvant intervenir (arrachement du proton acide de l'alcyne par exemple). Le taux de substitution maximal de 8 % a ensuite été obtenu avec une quantité de 6 g de PCL pour 300 mL de solvant. Dans le but d'augmenter la production de PCL propargylée, une dernière expérience a été menée avec la même concentration mais des quantités plus élevées. Cependant, cette augmentation des quantités a mené à une diminution de l'efficacité de la réaction et du taux de substitution, sous doute en raison d'une inadaptation du système réactionnel sous-dimensionné par rapport aux quantités utilisées.

En conclusion, les essais de propargylation réalisés ont mené à la détermination des conditions de synthèse permettant d'avoir une efficacité de greffage maximale avec un taux de substitution d'environ 8 % pouvant être obtenu de manière reproductible (4 lots). Ces conditions (refroidissement éthanol-azote, concentration de 6 g / 300 mL) ont été employées pour produire la PCL propargylée, dotée de fonctions alcyne photoréactives, et destinée à être réticulée sous irradiation UV.

Masse de PCL (g)	Volume de THF (mL)	Taux de substitution	GPC	
			\overline{Mn} (kg/mol)	\overline{D}
3	300	3,3 %	22,4	2,3
6	300	8 %	23,3	2,7

Tableau III-5 : Exemples de propriétés de PCL propargylées

2.2.2. Réticulation

Pour procéder à la réticulation du polymère, des films ont été préparés par évaporation de solvant à partir de solutions de PCL propargylée et de PETMP, l'agent de réticulation. Les produits Irgacure[®] sont des photoamorceurs générateurs de radicaux qui favorisent la réaction thiol-yne. Deux d'entre eux, l'Irgacure[®] 2959 et le 651, sont particulièrement répandus en raison de leur efficacité, le 2959 est par ailleurs connu pour sa bonne biocompatibilité et son caractère hydrosoluble [278, 279]. Ils ont été incorporés à certains échantillons afin d'étudier leur influence sur la réticulation de la PCL.

Les premiers essais ont montré que les films obtenus, malgré la réticulation, avaient tendance à se fissurer au cours de l'évaporation du solvant. Malgré le faible nombre de coupures de chaînes que cela implique (entre 0,25 et 0,50 % de liaisons ester hydrolysées par macromolécule), il est apparu que la diminution de masse molaire constatée au cours de la propargylation (masses finales comprises entre 12 et 23 kg/mol selon les cas) avait eu un impact important sur les propriétés du polymère en diminuant ses propriétés mécaniques et en limitant son caractère filmogène. Les expériences de réticulation ont donc été réalisées à partir de mélanges de PCL propargylée et de PCL non modifiée.

Des films contenant différentes proportions massiques de PCL propargylée ont donc été préparés et irradiés par rayonnement UV. Comme lors de la réticulation par voie nitrène, les échantillons irradiés ont été immergés dans un solvant pour étudier leur solubilité. Une portion insoluble a été obtenue à partir de tous les échantillons contenant de la PCL propargylée. La quantité de matière insoluble (ou fraction de gel) a augmenté presque linéairement avec la proportion de PCL propargylée dans le mélange (*Figure III-30*). On peut constater que les résultats obtenus sans Irgacure[®] sont légèrement inférieurs aux autres, ce qui montre une efficacité de réticulation augmentée en présence de ces photoamorceurs. Il est en revanche difficile de distinguer une différence entre les deux Irgacure[®], à l'exception des échantillons constitués uniquement de PCL propargylée. L'Irgacure[®] 651 semble alors légèrement plus efficace (différence peu significative), ce qui semble cohérent dans la mesure où l'Irgacure[®] 2959 est généralement privilégié, non pas en raison de son efficacité mais plutôt de sa biocompatibilité.

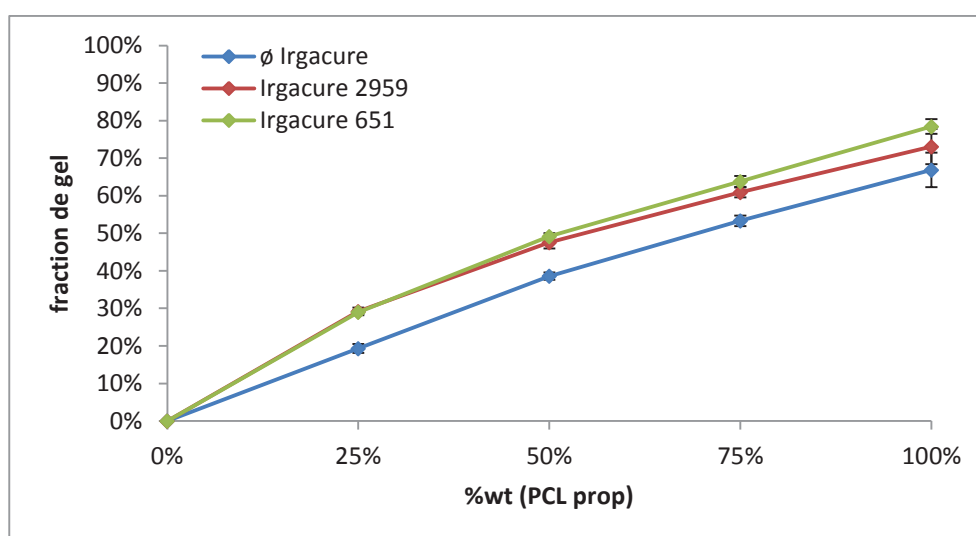


Figure III-30 : Réticulation de la PCL en fonction de la proportion de PCL propargylée

D'une manière générale, on peut dire que le rendement de la réaction thiol-yne de réticulation a été élevé, que le milieu contienne un photoamorceur ou pas. Il est intéressant de noter que les échantillons contenant 100 % de PCL propargylée ont mené à une réticulation comprise entre 67 et 78 %, tandis que ceux n'en contenant que 25 % ont réticulé jusqu'à 29 % en présence de photoamorceur. Ce constat nous permet de penser que la fraction de gel serait non seulement constituée de la PCL propargylée effectivement réticulée mais aussi d'une faible quantité de PCL non réticulée, possiblement piégée au sein du réseau tridimensionnel généré par la réticulation (**Figure III-31**). Cela pourrait être dû à la création d'un réseau plus densément réticulé grâce aux amorceurs.

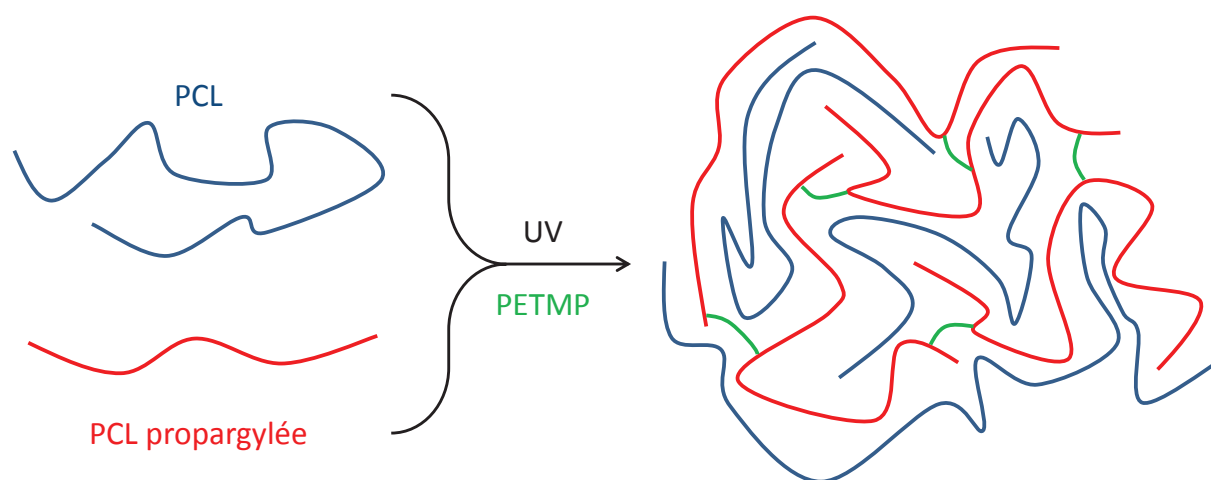


Figure III-31 : Architecture du mélange de PCL et de PCL propargylée réticulée

Les fractions de gel récupérées lors des tests de solubilité ont ensuite été utilisées pour mesurer le gonflement du polymère réticulé après une nouvelle immersion dans un solvant (**Figure III-32**). Les valeurs élevées de gonflement obtenues (jusqu'à près de 2100 %) sont un deuxième signe de la réticulation des polymères. On peut par ailleurs observer une diminution du gonflement avec la proportion de PCL propargylée qui révèle la formation d'un réseau réticulé de plus en plus dense à mesure que le milieu est riche en PCL propargylée. Les gonflements obtenus sans Irgacure[®] supérieurs à ceux obtenus avec l'Irgacure[®] 2959, eux-mêmes plus élevés que ceux de l'Irgacure[®] 651 confirment la hiérarchie au sein de ces échantillons quant à l'efficacité et la densité de réticulation. En effet, plus celle-ci est importante, plus le réseau réticulé est dense et limite l'insertion des molécules du solvant.

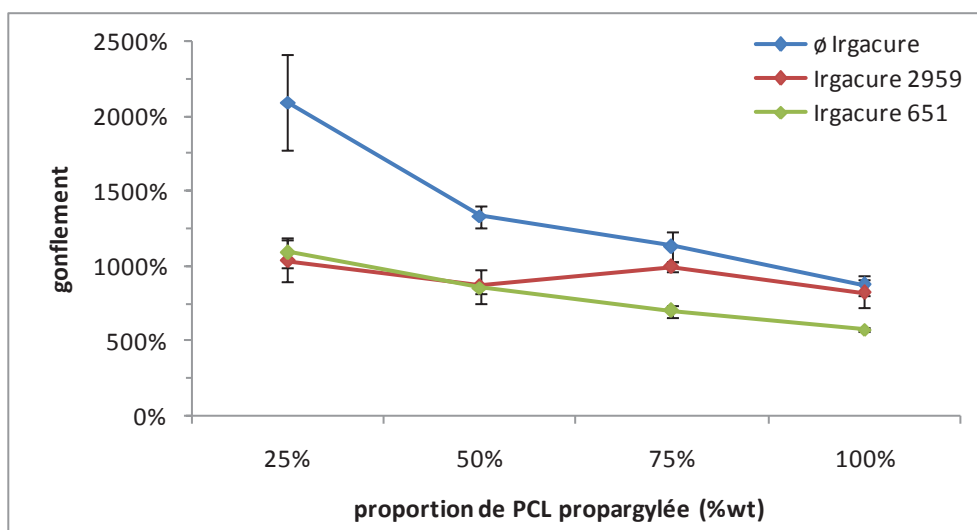


Figure III-32 : Gonflement de la fraction réticulée en fonction de la proportion de PCL propargylée

Des analyses TGA ont également été effectuées sur ces fractions de gel après séchage (échantillons contenant 100 % de PCL propargylée) afin de déterminer les conséquences de la réticulation et de la formation du réseau sur leurs propriétés de dégradation thermique. Les thermogrammes TGA obtenus avec les différents polymères (**Figure III-33**) montrent que la propargylation et la diminution de masse molaire qu'elle entraîne provoque une dégradation thermique précoce de la PCL propargylée (température de début de dégradation de 354°C) par rapport à la PCL non modifiée (422°C). En revanche, l'irradiation de la PCL propargylée en présence du PETMP provoque un retardement de cette dégradation thermique (entre 395 et 410°C), signe qu'il y a effectivement eu création d'un réseau réticulé.

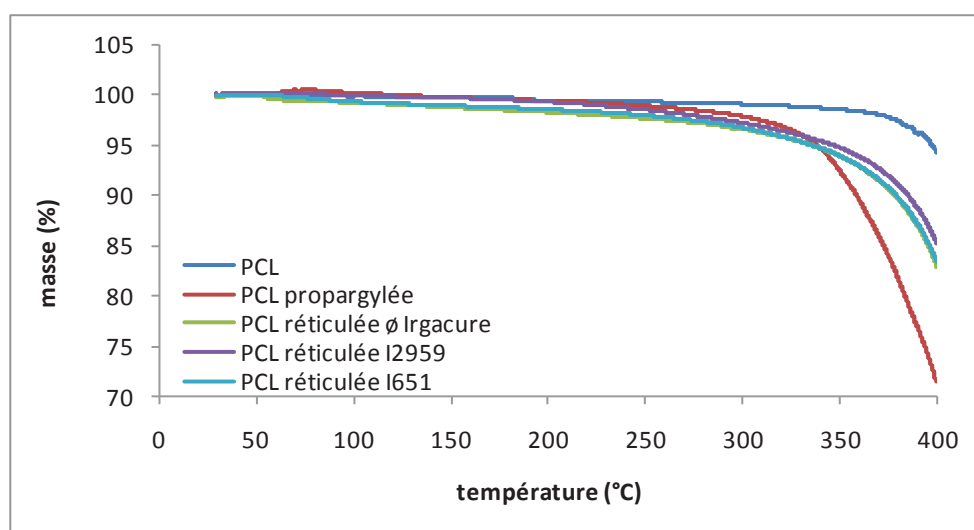


Figure III-33 : Thermogrammes TGA de la PCL, de la PCL propargylée, et de PCL réticulées

L'évaluation des propriétés thermiques a été complétée par une étude DSC, avec des conséquences de la réticulation attendues sur la transition vitreuse et la fusion du polymère. La plupart des phénomènes observés ont en réalité été imputés aux proportions de PCL non modifiée et de PCL propargylée dans les échantillons puisque la propargylation, en provoquant les scissions de chaînes, a modifié les propriétés thermiques du polymère (diminution des températures et des enthalpies de fusion et de cristallisation).

La comparaison des analyses DSC de la PCL propargylée non réticulée et de la PCL propargylée réticulée avec ou sans Irgacure[®] (échantillons contenant 100 % de PCL propargylée) ont toutefois permis d'observer l'influence de la réticulation (**Figure III-34**). Celle-ci a en effet provoqué une diminution de la température de fusion, initialement de 45,5°C et comprise entre 40 et 42°C après la réaction. Cette diminution s'explique par une baisse de la mobilité des chaînes en raison de leur réticulation qui conduit à la formation de phases cristallines moins stables dont la fusion survient alors prématurément.

L'enthalpie de fusion a elle aussi diminué, ce qui traduit une baisse de la cristallinité après la réticulation. L'importance de cette évolution de l'enthalpie confirme l'efficacité élevée de la réaction entre la PCL propargylée et le PETMP. Il est de plus important de souligner les différences constatées entre les échantillons avec et sans Irgacure[®], qu'il s'agisse de la température ou de l'enthalpie de fusion, qui confirment à nouveau l'efficacité supérieure de l'Irgacure[®] 2959 et surtout du 651.

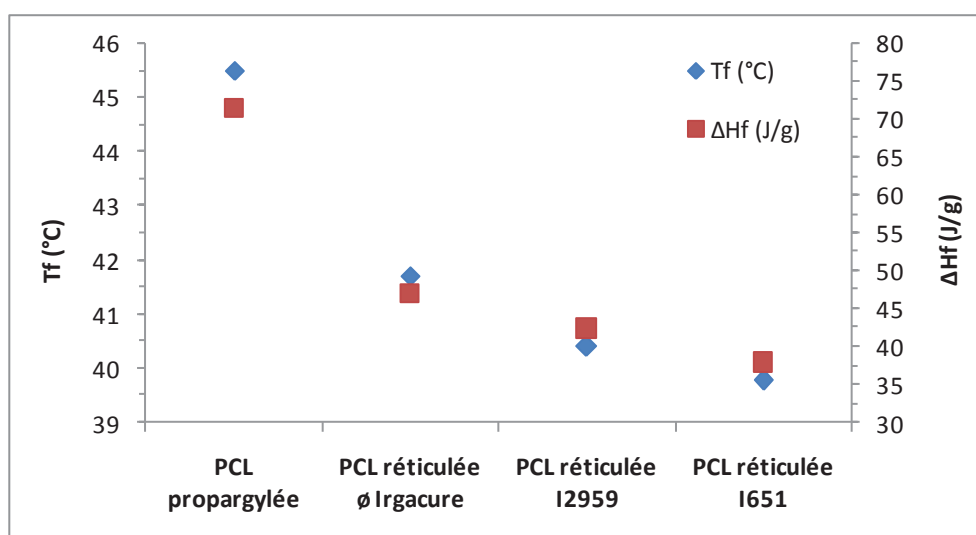


Figure III-34 : Caractéristiques de la fusion de la PCL propargylée avant et après réticulation

Suite à ces diverses études portant sur la réticulation, et dans la mesure où l'objectif de cette stratégie était d'obtenir des PCL aux propriétés mécaniques (et particulièrement aux propriétés élastiques) améliorées, les échantillons réticulés ont subi des tests de traction (*Figure III–35*).

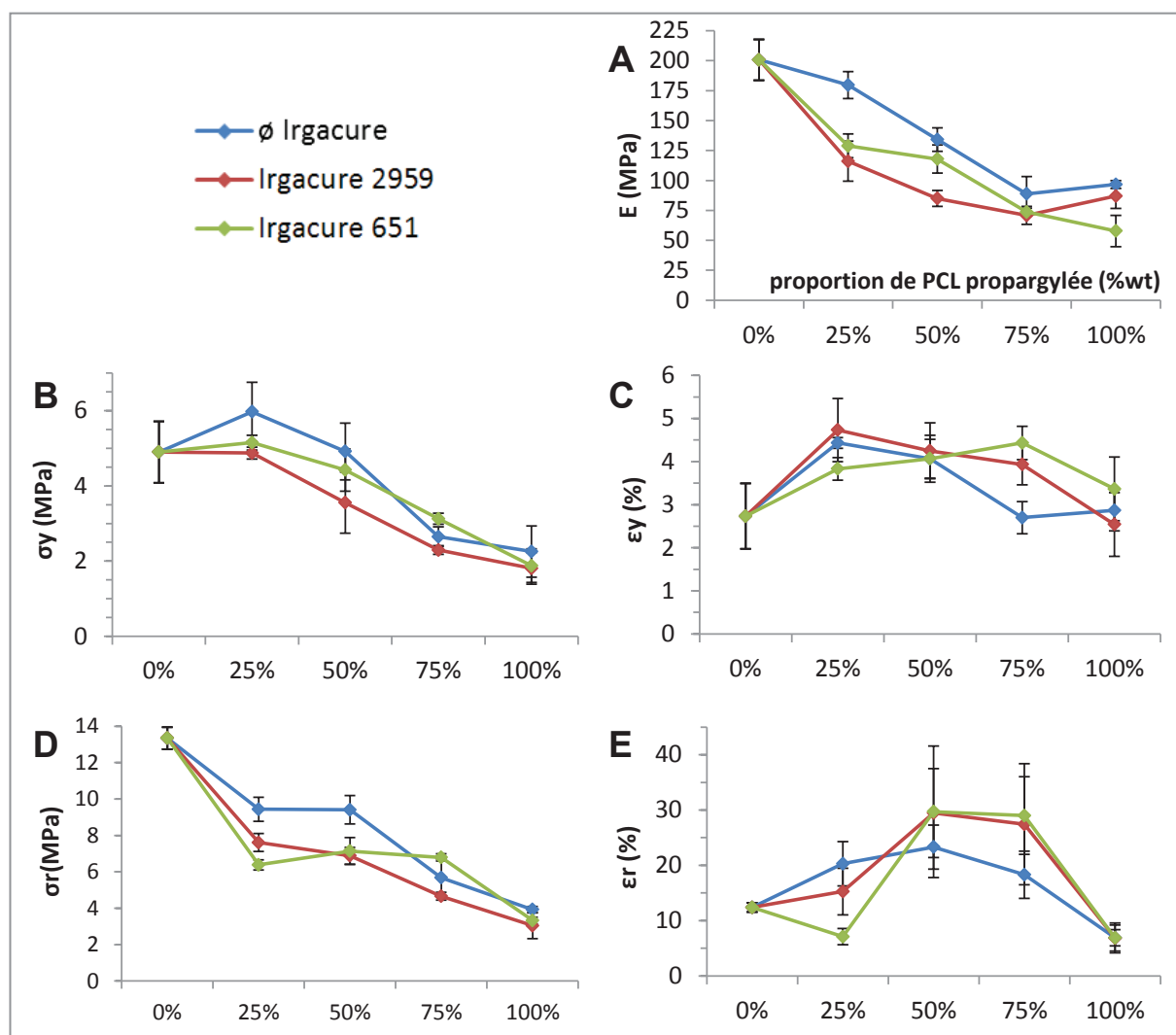


Figure III–35 : Propriétés mécaniques des PCL réticulées : module d'Young E (A), limite d'élasticité σ_y (B), déformation à la limite d'élasticité ε_y (C), contrainte de rupture σ_r (D), déformation de rupture ε_r (E)

Le module d'Young ainsi que la contrainte de rupture et la limite élastique (E , σ_y et σ_r) ont globalement montré une diminution avec l'augmentation de la proportion de PCL propargylé. La réticulation semble ne pas avoir compensé la baisse de la masse molaire due à la propargylation pour ces propriétés.

En revanche, la réticulation semble avoir eu une influence sur les déformations caractéristiques (ϵ_y et ϵ_r) des polymères. Pour ces deux propriétés, les valeurs commencent par augmenter et atteindre un maximum entre 25 et 75 % de PCL propargylée pour ensuite diminuer. Les valeurs maximales des déformations de rupture sont par exemple atteintes pour tous les échantillons à 50 % de PCL propargylée. Cette augmentation paraît significative dans la mesure où le rapport des valeurs maximales et minimales est notamment supérieur à 4 dans le cas des PCL réticulées en présence d'Irgacure®.

En ce qui concerne la déformation à la limite d'élasticité, l'augmentation observée est plus limitée (rapport entre les valeurs maximales et minimales n'excédant pas 2). Toutefois, on peut considérer que la réticulation a permis de compenser la diminution de la masse molaire et même d'améliorer légèrement ces deux propriétés qui caractérisent l'élasticité d'un matériau.

Pour conclure, les expériences de propargylation ont permis d'optimiser la réaction de greffage et ainsi d'obtenir une fonctionnalisation maximale de la PCL de 8 %. La réaction secondaire de scission de chaînes, bien que minoritaire, s'est avérée être la principale limitation de cette technique dans son application à la formation de biomatériaux à propriétés mécaniques améliorées du fait du très fort impact de la diminution des masses molaires sur ces propriétés mécaniques. Il faut cependant noter que le greffage de fonctions alcyne sur la PCL a constitué un moyen très efficace de réticulation grâce à l'utilisation d'un tétrathiol comme agent de réticulation par réaction thiol-yne sous irradiation UV.

Toutes les analyses ont en effet mis en évidence une importante réticulation du polymère, notamment en présence de photoamorceurs Irgacure® (jusqu'à 78 % fraction de gel). En mélangeant PCL non modifiée et PCL propargylée et grâce à la création d'un réseau réticulé, une augmentation de la déformation à la limite d'élasticité et surtout de la déformation de rupture a été obtenue. En d'autres termes, la réticulation photochimique par voie thiol-yne de la PCL a permis d'apporter une légère amélioration de son caractère élastique. Les propriétés mécaniques finales restent toutefois relativement faibles et il semble nécessaire d'optimiser encore le procédé qui pourra être extrapolé à d'autres applications.

3. Conclusions

Dans l'optique de mettre au point un matériau destiné au développement d'une matrice de régénération ligamentaire, plusieurs stratégies de synthèse ont été étudiées. Tout d'abord, nous avons synthétisé et évalué des **polymères thermoplastiques** en raison de la large utilisation de ce type de polymères en ingénierie tissulaire. L'un de leurs principaux avantages est leur facilité de mise en œuvre puisque ce type de polymère est fusible et peut donc être façonné grâce à des procédés tels que le moulage ou l'extrusion. L'originalité de notre approche a été d'associer au PLA, polyester aliphatique dégradé très répandu dans les applications biomédicales pour des produits implantables temporaires, le Pluronic et le Tetronic, ce qui nous a permis de jouer à la fois sur l'architecture des copolymères mais aussi sur leur cristallinité afin d'optimiser les propriétés en vue d'une application ligamentaire. Ces deux copolymères commerciaux constitués de PEG et de PPG ont en effet permis de moduler les propriétés du PLA, polymère très rigide et hydrophobe.

Après la synthèse de plusieurs formulations et grâce à différents critères d'évaluation, notamment un test de dégradation *in vitro* de sept semaines, nous sommes parvenus à la sélection de plusieurs formulations semblant répondre aux exigences du projet. Les propriétés mécaniques de ces copolymères de 200 kg/mol rentrent dans les gammes de valeurs attendues pour un LCA. De plus, la conservation des propriétés mécaniques de ces polymères au cours de la dégradation s'est révélée satisfaisante.

Dans un deuxième temps, une stratégie alternative visant à développer des **élastomères** à partir de polymères dégradables et via des procédés de réticulation photochimique a été envisagée. Tout d'abord, nous avons cherché à réticuler du PLA par **voie nitrène**. Cette voie de synthèse présente l'avantage d'être très simple puisque l'obtention des agents de réticulation s'est faite grâce à une simple estérification et la réticulation par incorporation de ces agents dans la matrice polymère et irradiation UV. Malgré le développement d'agents de réticulation de différentes longueurs et fonctionnalités, la réticulation obtenue sur le PLA est restée limitée, en tout cas insuffisante pour améliorer ses propriétés mécaniques. Ces résultats ont toutefois ouvert la porte à une stratégie prometteuse en montrant que la réaction de greffage et même de réticulation entre des agents polyazidés et un polymère dégradé peu réactif comme le PLA était possible.

Suite à cette étude, une autre méthode d'obtention d'**élastomères** dégradables a été développée. S'appuyant sur des résultats préalablement obtenus au sein du laboratoire, ce procédé a cette fois consisté à apporter une fonctionnalité à un autre polymère dégradable, la PCL, en greffant des groupements alcyne sur son squelette carboné. Grâce à un tétrathiol employé comme agent de réticulation, une réaction photochimique **thiol-yne** a pu être réalisée par activation photochimique sous irradiation UV. Une importante efficacité de la réaction de réticulation a été constatée par l'étude de la solubilité et du gonflement des polymères dans un solvant et par les analyses thermiques.

Cependant, le procédé de propargylation ayant lieu dans des conditions entraînant des scissions des chaînes macromoléculaires, les polymères ont subi une importante perte de leurs propriétés mécaniques qui n'a pas été entièrement compensée par la réticulation. Seules les déformations de rupture et les déformations à la limite d'élasticité ont pu être augmentées après réticulation. Encore plus que pour la voie nitrène, ces résultats très encourageants nous offrent de nouvelles perspectives dans la recherche de structures élastomères dégradables.

Toutefois, et au vu des différents résultats constatés (*Annexe 2*), les stratégies de réticulation décrites nécessitent encore mise au point et optimisation. C'est pourquoi, pour la conception d'un prototype de support de régénération ligamentaire, nous avons décidé de poursuivre nos travaux avec les polymères thermoplastiques étudiés en premier lieu. L'étude plus approfondie de leurs propriétés, notamment face à la dégradation, ainsi que leur facilité de mise en œuvre ont été mises à profit pour la suite du projet.

Le chapitre suivant présente les trois étapes menées pour aboutir à l'ingénierie tissulaire du ligament. Tout d'abord, un procédé de mise en œuvre textile a été appliqué aux copolymères thermoplastiques sélectionnés pour concevoir une architecture adaptée à la régénération du ligament. Diverses expériences de cytocompatibilité ont ensuite été pratiquées afin de vérifier l'absence de toxicité des matériaux utilisés vis-à-vis de cellules souches. Enfin, des tests de différenciation cellulaire de CSM ont été réalisés dans le but d'obtenir, à partir de ces cellules souches, des fibroblastes de type ligamentocyte colonisant les supports polymères préparés.

CHAPITRE IV

DEVELOPPEMENT DE LA MATRICE DE REGENERATION LIGAMENTAIRE

CHAPITRE IV : DEVELOPPEMENT DE LA MATRICE DE REGENERATION LIGAMENTAIRE

1. Mise en œuvre textile

Comme la plupart des travaux actuels le montrent, la conception d'une structure textile semble être une réponse adaptée aux exigences liées à l'ingénierie tissulaire du ligament. C'est donc vers ce type de matrice que nous avons orienté nos travaux. Travaillant avec des polymères thermoplastiques, nous avons dû procéder en deux étapes. A partir des copolymères synthétisés, il a tout d'abord fallu développer des fibres grâce à un procédé de microextrusion. Après la fabrication et l'étude de ces fibres, la seconde étape a consisté à associer les techniques de tressage et de torsadage pour parvenir à un prototype de matrice de régénération évalué par la suite mécaniquement et biologiquement.

1.1. Caractérisation des fibres

Les deux copolymères 94P200 et 94T200 ont été microextrudés afin d'obtenir des microfibrilles (*Figure IV-1A*). Les différents paramètres d'extrusion (vitesse de rotation des vis, vitesse d'enroulement) ont été fixés suivant les conseils des responsables de l'appareil. Dans le cas de nos copolymères, nous avons pu obtenir une bonne fluidité d'extrusion avec une température de chauffage de 200°C et avons donc travaillé uniquement à cette température. Le seul paramètre étudié parmi les conditions d'extrusion a été le diamètre de la filière de sortie (500, 750 ou 1000 μm). Les différentes fibres obtenues ont été observées au microscope afin d'estimer leur diamètre. Il a été constaté que sur une même bobine, le diamètre pouvait varier de manière importante (par exemple de 60 à 150 μm avec la filière de 750 μm) (*Figure IV-1B*). Ces variations ont également été observées par le laboratoire possédant la microextrudeuse qui nous a été prêtée pour cette expérience. Une étude menée sur des fibres extrudées en polyamide (diamètre relevé tous les mètres) a révélé que, pour un diamètre moyen de 142 μm , l'écart type était de 37 μm . Cette hétérogénéité semble donc inhérente à l'appareillage utilisé. Il serait toutefois possible de pallier cette hétérogénéité, ou au moins de la réduire, en optimisant les conditions d'extrusion et notamment en augmentant la température, ce qui serait cependant susceptible de causer une importante dégradation thermique des polymères.

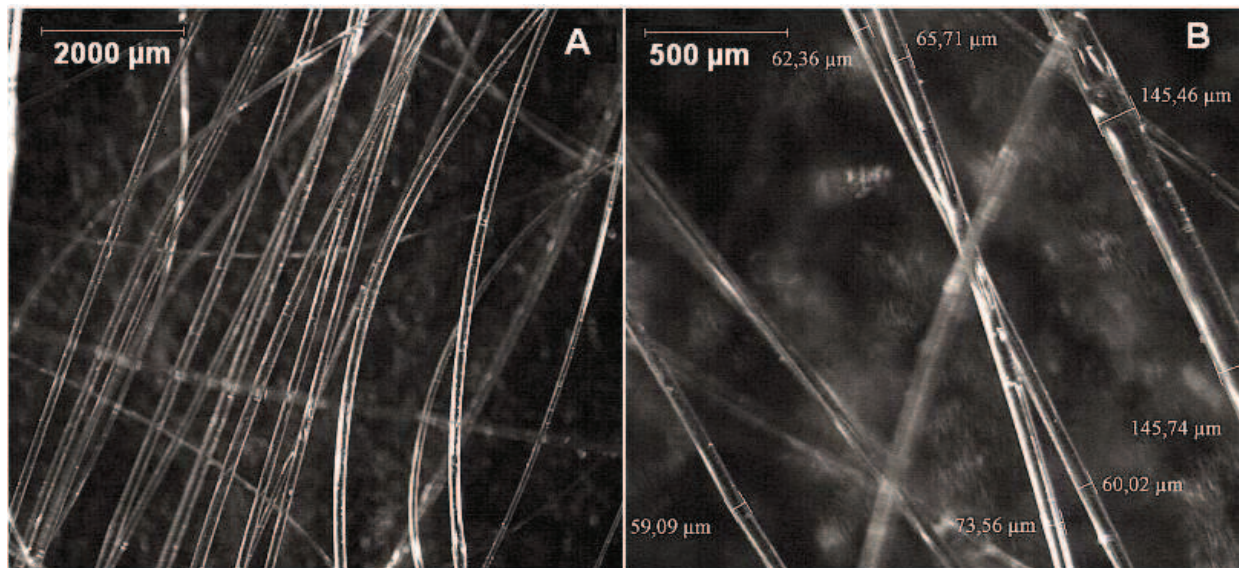


Figure IV-1 : Observation au microscope de fibres extrudées de 94T200 (filière 750 μm) grossissement $\times 10$ (A) et $\times 40$ (B)

Si une telle étude n'a pas pu être menée dans le cadre de notre projet, nous avons constaté que l'utilisation de la filière de 1000 μm conduisait à une variation moins importante des diamètres des fibres. Dans un souci de reproductibilité des résultats, nous n'avons donc utilisé que cette dernière pour la suite de l'étude.

Les fibres obtenues grâce à la filière de 1000 μm ont ensuite été caractérisées mécaniquement en traction (*Tableau IV-1*).

Copolymère		E (MPa)	σ_y (MPa)	ϵ_y (%)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
94P200	film	556 +/- 50	11 +/- 1	2,8 +/- 0,5	18 +/- 2	613 +/- 37
	fibres	2181 +/- 165	29 +/- 3	1,3 +/- 0,2	33 +/- 1	11 +/- 5
94T200	film	455 +/- 24	14 +/- 1	3,5 +/- 0,3	20 +/- 1	765 +/- 55
	fibres	2299 +/- 31	16 +/- 1	0,7 +/- 0,0	22 +/- 6	10 +/- 5

Tableau IV-1 : Propriétés mécaniques des copolymères avant et après extrusion

On peut constater que l'extrusion a eu globalement tendance à rendre les polymères plus rigides et résistants, en particulier dans le cas du 94P200 dont le module d'Young, la limite d'élasticité et la contrainte de rupture ont subi une importante augmentation. Les polymères ont en revanche perdu en déformabilité, que ce soit à la limite d'élasticité ou en rupture. Le procédé de microextrusion et l'étirage des chaînes qu'il occasionne sont certainement à l'origine d'une importante cristallisation du matériau et de ces évolutions concernant les propriétés mécaniques.

Les masses molaires et propriétés thermiques ont également été déterminées après extrusion afin d'évaluer les conséquences de ce procédé sur les polymères (*Tableau IV-2*). Après avoir séjourné environ une heure dans la chambre d'alimentation chauffée à 200 °C, les polymères semblent avoir subi une légère dégradation. Bien que les analyses RMN n'aient pas révélé de variation des masses molaires après extrusion, une diminution de ces masses ainsi qu'une augmentation de la dispersité ont été mis en évidence par GPC. Comme expliqué précédemment (cf. § III.1.1.1), les données obtenues par RMN sont considérées comme plus fiables. De plus, la dégradation thermique des polymères paraît relativement restreinte au vu des propriétés thermiques et notamment de la très faible variation rencontrée par la température de transition vitreuse. Par ailleurs, on peut noter que l'extrusion a provoqué une augmentation de l'enthalpie de fusion (de 112 % pour 94P200 et 556 % pour 94T200) synonyme d'augmentation de la cristallinité des polymères, ce qui confirme l'hypothèse formulée quant à l'évolution des propriétés mécaniques.

Polymère	\overline{Mn} (kg/mol)		Đ	T _g (°C)	T _f (°C)	ΔH _f (J/g)	
	RMN	GPC					
94P200	après synthèse	169,4	103,6	2,0	48,2	150,0	6,8
	après extrusion	164,8	60,4	2,5	46,0	151,7	14,4
94T200	après synthèse	171,7	91,9	1,7	46,2	150,1	3,6
	après extrusion	190,4	50,8	2,3	45,7	152,3	23,6

Tableau IV-2 : Masses molaires et propriétés thermiques des copolymères avant et après extrusion

1.2. Caractérisation de la matrice textile

Les fibres obtenues par microextrusion (filière 1000 μm) ont été utilisées afin de développer des prototypes de matrice de régénération ligamentaire. Pour cela, un procédé inspiré des techniques actuellement décrites dans la littérature [153, 155, 159, 170, 181] et combinant torsadage et tressage a été appliqué à ces fibres (**Figure IV-2**). L'un des principaux objectifs de ce type de mise en œuvre étant la modulation des propriétés mécaniques des matériaux (et plus particulièrement les propriétés élastiques), ces matrices ont également été caractérisées mécaniquement.



Figure IV-2 : Observation au microscope d'une matrice textile préparée par torsadage et tressage

Il est tout d'abord intéressant d'analyser le comportement en traction de ces matrices textiles. Les courbes de traction obtenues au cours des analyses mécaniques ont en effet un profil particulier découpé en trois zones distinctes (**Figure IV-3**).

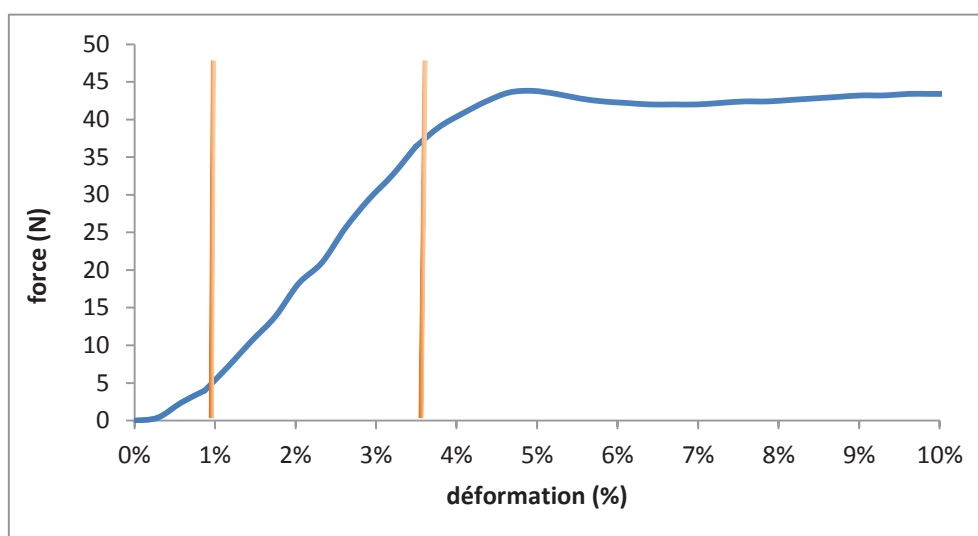


Figure IV-3 : Courbe déformation-force d'une matrice textile

Dans un premier temps, la force mesurée a légèrement augmenté avec la déformation. Le profil a ensuite montré une zone où l'augmentation de la force est moins prononcée et enfin une zone dans laquelle la force stagne voire diminue jusqu'à finalement mener à la rupture de l'échantillon. Ces trois étapes correspondent à trois phénomènes différents : tout d'abord le glissement et le réarrangement des fibres les unes par rapport aux autres, puis la déformation élastique de ces fibres et enfin leur déformation plastique menant à la rupture. Ce profil mécanique est comparable au profil décrit pour les ligaments et tendons (cf. § I.1.2.3) découpé en trois régions (*toe region*, zone linéaire et zone d'endommagement). L'obtention d'un tel profil mécanique pour nos matrices textiles constitue d'ores et déjà une avancée dans la volonté de produire des supports approchant les propriétés mécaniques des ligaments.

Ces essais de traction ont également permis de mesurer les propriétés mécaniques des matrices (**Tableau IV-3**). Comme espéré, la technique de mise en œuvre textile a conduit à une importante modification de ces propriétés par rapport aux fibres. On peut notamment souligner la baisse du module d'Young dont la valeur (346 et 440 MPa) se rapproche de celle du LCA (49-163 MPa) et l'augmentation de la déformabilité à la limite d'élasticité (5,4 et 6,4%) et à la rupture (78 et 20%). L'association de plusieurs fibres qui ont la capacité de glisser les unes par rapport aux autres, phénomène que l'on ne pourrait pas obtenir avec un unique objet massif, est à l'origine de ces modifications. Malgré la supériorité des matrices 94T200 en termes de résistance mécanique (limite d'élasticité, contrainte de rupture), celles préparées avec le 94P200 paraissent être le meilleur choix en raison de leur module d'Young moins élevé (346 MPa) réduisant ainsi le risque de *stress shielding*, et pour leur plus grande déformabilité, en particulier à la rupture (78%).

Polymère		E (MPa)	σ_y (MPa)	ϵ_y (%)	σ_r (MPa)	ϵ_r (%)
94P200	fibres	2181 +/- 165	29 +/- 3	1,3 +/- 0,2	33 +/- 1	11 +/- 5
	matrice	346 +/- 109	19 +/- 3	6,4 +/- 0,7	24 +/- 3	78 +/- 23
94T200	fibres	2299 +/- 31	16 +/- 1	0,7 +/- 0,0	22 +/- 6	10 +/- 5
	matrice	440 +/- 99	21 +/- 2	5,4 +/- 2,0	29 +/- 1	20 +/- 2
LCA		49 - 163	x	7 - 16	14 - 36	19 - 36

Tableau IV-3 : Propriétés mécaniques des copolymères avant et après torsadage et tressage

Il est bien souvent difficile d'établir une comparaison entre nos matrices et celles décrites dans la littérature dans la mesure où les informations fournies ne sont pas toujours suffisantes pour cela. Les propriétés mécaniques sont en effet parfois exprimées en N et N/mm (non rapportées à la section des échantillons) et les dimensions précises des échantillons non communiquées. Il est toutefois possible de se référer à certains travaux. Par exemple, certaines matrices ligamentaires développées grâce à des procédés de tressage ou de tricotage de fibres obtenues par *electrospinning* (PLA ou PLGA) ont montré des propriétés mécaniques largement insuffisantes compte tenu des propriétés des ligaments.

Les faibles valeurs de modules d'Young, de limites d'élasticité ou de contraintes de rupture (valeurs respectivement comprises entre 3 et 55 MPa pour E, entre 3 et 4 MPa pour σ_y , entre 6 et 8 MPa pour σ_r) traduisent notamment une importante faiblesse mécanique [159, 160, 172]. Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation de fibres obtenues par *electrospinning* seules ne permet pas d'aboutir à des matrices aux propriétés suffisantes tandis que les structures obtenues à partir de fibres de dimensions plus élevées telles que les nôtres semblent conduire à des propriétés mécaniques plus adaptées [18, 129].

Il est par ailleurs particulièrement intéressant de comparer nos résultats avec certains de ceux présentés par Laurencin *et al.* qui ont mené des travaux sur des structures similaires aux nôtres. Dans ces études [153, 181], les auteurs ont notamment comparé l'influence du procédé de mise en œuvre textile (tressage, torsadage ou combinaison des deux) et ont désigné l'échantillon baptisé "4 braid 60-72" (échantillon obtenu par tressage et torsadage de fibres de PLLA) comme étant le meilleur des échantillons étudiés pour une application en ingénierie tissulaire du LCA en raison de ses propriétés mécaniques. Si, selon certains critères étudiés, ce produit apparaît effectivement plus adapté que nos propres matrices, par exemple avec une contrainte de rupture de 82 MPa et une longueur de *toe region* de 4%, il semble en revanche moins intéressant sur d'autres aspects. Sa déformation de rupture est en effet de 31 % (contre 78 % pour 94P200) mais sa principale limitation semble être liée à sa rigidité puisqu'il est doté d'un module d'Young de 757 MPa. Comme cela a été évoqué plus tôt, une valeur aussi élevée comparativement au LCA (49 à 163 MPa) peut provoquer des phénomènes de *stress shielding* qui pourraient empêcher la formation de néotissus de bonne qualité. Le choix de travailler sur la chimie du matériau et d'incorporer des blocs tels que le Pluronic ou le Tetronic dans le PLA présente donc des avantages sur le plan mécanique.

L'évaluation mécanique de nos matrices a ensuite été complétée par l'analyse des conséquences de sollicitations cycliques en traction. L'application à une matrice textile d'une centaine de cycles traction/relaxation a permis de mettre en évidence une évolution de la déformation au cours du temps (**Figure IV-4**). La déformation maximale (juste avant la relaxation) et la déformation à l'état relaxé (juste avant la traction) ont en effet présenté une légère augmentation au fur et à mesure des cycles (respectivement de 0,95 à 1,08 % et de 0,04 à 0,1 %) qui suggère la nécessité d'une "éducation mécanique" de la matrice textile. Le module d'Young mesuré au début de chaque étape de traction (**Figure IV-5**) a montré, quant à lui, une importante diminution dès les premiers cycles (de 4,5 à 1,0 GPa environ) avant de se stabiliser rapidement (à partir d'un vingtaine de cycles). Cette observation souligne également l'importance de cette notion d'éducation du matériau.

On peut noter que les valeurs de module d'Young mesurées au cours du test de sollicitation cyclique (**Figure IV-5**) sont bien au-delà des valeurs obtenues lors des essais de traction classiques. Cette différence est due à la vitesse de déformation imposée aux échantillons. Alors que cette dernière est fixée à 5 mm/min lors des essais statiques, l'appareil de DMA utilisé pour le test dynamique applique la force imposée de manière quasi-instantanée et impose donc une vitesse de déformation beaucoup plus élevée. Les propriétés mécaniques mesurées dans ces conditions sont évidemment différentes des mesures statiques, ce qui explique l'écart observé dans les mesures de modules d'Young entre ces deux types de tests.

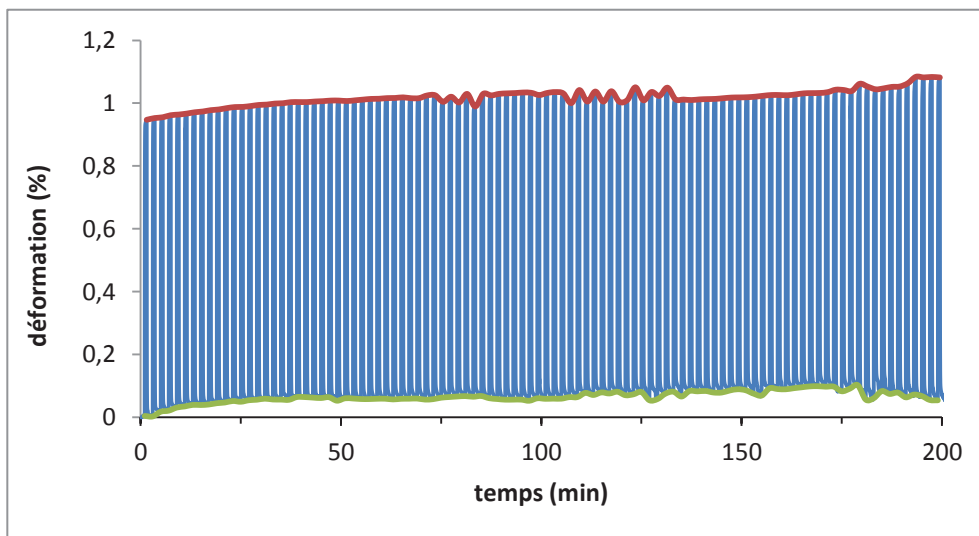


Figure IV-4 : Evolution de la déformation d'une matrice textile 94P200 sollicitée cycliquement

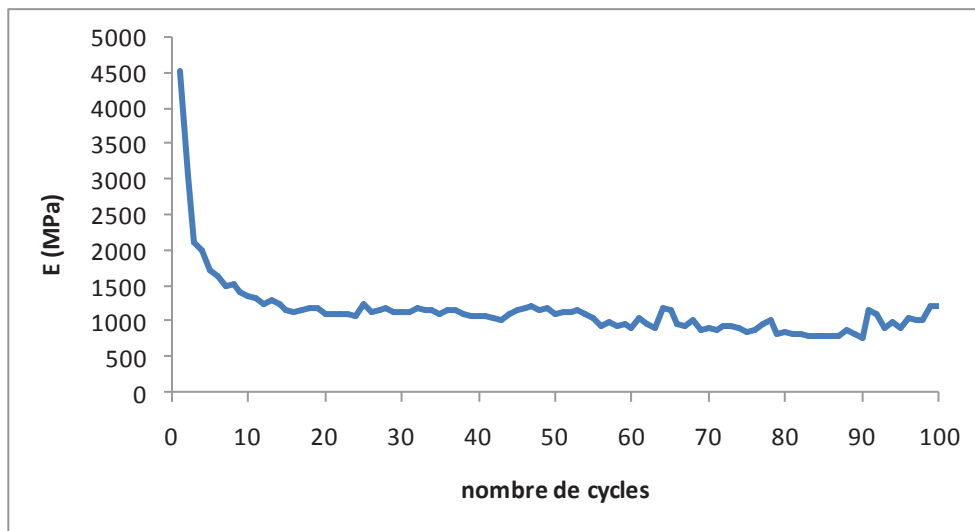


Figure IV-5 : Evolution du module d'Young d'une matrice textile 94P200 sollicitée cycliquement

Le choix d'adopter une stratégie de mise en œuvre textile en deux étapes, microextrusion puis torsadage et tressage, nous a donc permis d'aboutir à des prototypes de support ligamentaire. Non seulement cette stratégie a permis de se rapprocher fortement des propriétés mécaniques visées, mais elle a aussi conduit à des structures dont le profil mécanique ressemblait à celui d'un LCA. La notion d'éducation mécanique qui a été évoquée suscite toutefois des interrogations sur le devenir à long terme de ces matrices et de leur comportement mécanique. La suite de l'étude traite de leur évaluation biologique.

2. Cytocompatibilité

2.1. Avant mise en forme

Malgré la cytocompatibilité déjà démontrée du Pluronic et du Tetronic [280, 281] et avant de procéder aux tests de différenciation cellulaire, il a été nécessaire de confirmer l'absence de toxicité de nos copolymères vis-à-vis des CSM. Pour cela, des CSM C3 ont été ensemencées sur des pastilles de copolymères obtenues à partir de films moulés sous pression, sur des pastilles de PLA₉₄ et PLA₉₆ ainsi que sur le plastique TCPS des boîtes de culture comme témoin positif. La prolifération sur 2, 4 et 7 jours a ensuite été évaluée grâce au réactif *PrestoBlue* (**Figure IV-6**) qui reflète la quantité de cellules vivantes et métaboliquement actives.

Les résultats obtenus ont révélé une excellente prolifération cellulaire sur les copolymères 94P200 et 94T200, similaire à celle observée sur les PLA connus pour leur biocompatibilité. Bien que la prolifération sur les copolymères semble légèrement inférieure à celle sur le TCPS, une analyse de la variance réalisée grâce au test ANOVA a montré qu'il n'y avait en réalité aucune différence statistiquement significative entre ces proliférations après 7 jours ($p > 0,05$). De plus, on peut constater que la cinétique de prolifération sur les copolymères est également très proche de celle sur le TCPS, ce qui suggère l'absence de cytotoxicité éventuellement liée à des difficultés d'adhésion sur ce support polymère.

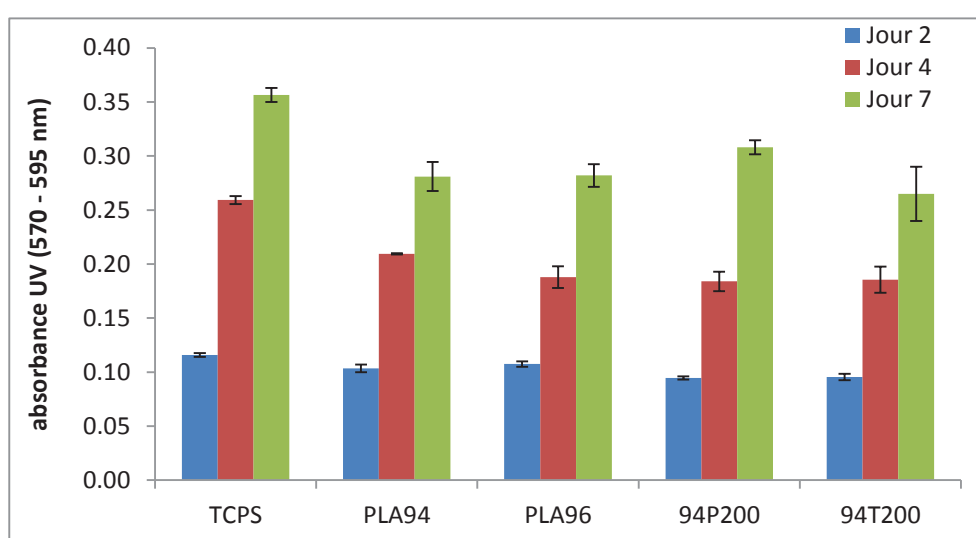


Figure IV-6 : Prolifération *in vitro* des cellules C3 sur différents polymères (test PrestoBlue)

Le marquage Live/Dead de cellules C3 cultivées sur les copolymères pendant 7 jours et leur observation par microscopie confocale à fluorescence (MCF) ont permis d'obtenir une confirmation visuelle de la cytocompatibilité. La **Figure IV-7 (A et B)** montre en effet que la surface du polymère a été complètement recouverte par les cellules vivantes (ici colorées en vert) tandis que très peu de cellules mortes (colorées en rouge) sont présentes, indiquant l'absence d'effet cytotoxique sur les cellules. Par ailleurs, une observation faite sur le bord d'un échantillon où la densité cellulaire était moindre (**Figure IV-7 C et D**) a révélé que les CSM avaient adopté une morphologie allongée et fusiforme (morphologie fibroblastique typique de cellules adhérentes).

L'association de tous ces résultats a donc non seulement prouvé la cytocompatibilité des copolymères vis-à-vis des CSM C3, mais a également montré qu'ils permettaient à la fois la prolifération cellulaire et l'adoption d'une morphologie normale (de type fibroblastique) ainsi qu'une activité métabolique. Aucun problème de biocompatibilité de ces copolymères n'a donc été mis en évidence grâce aux tests réalisés.

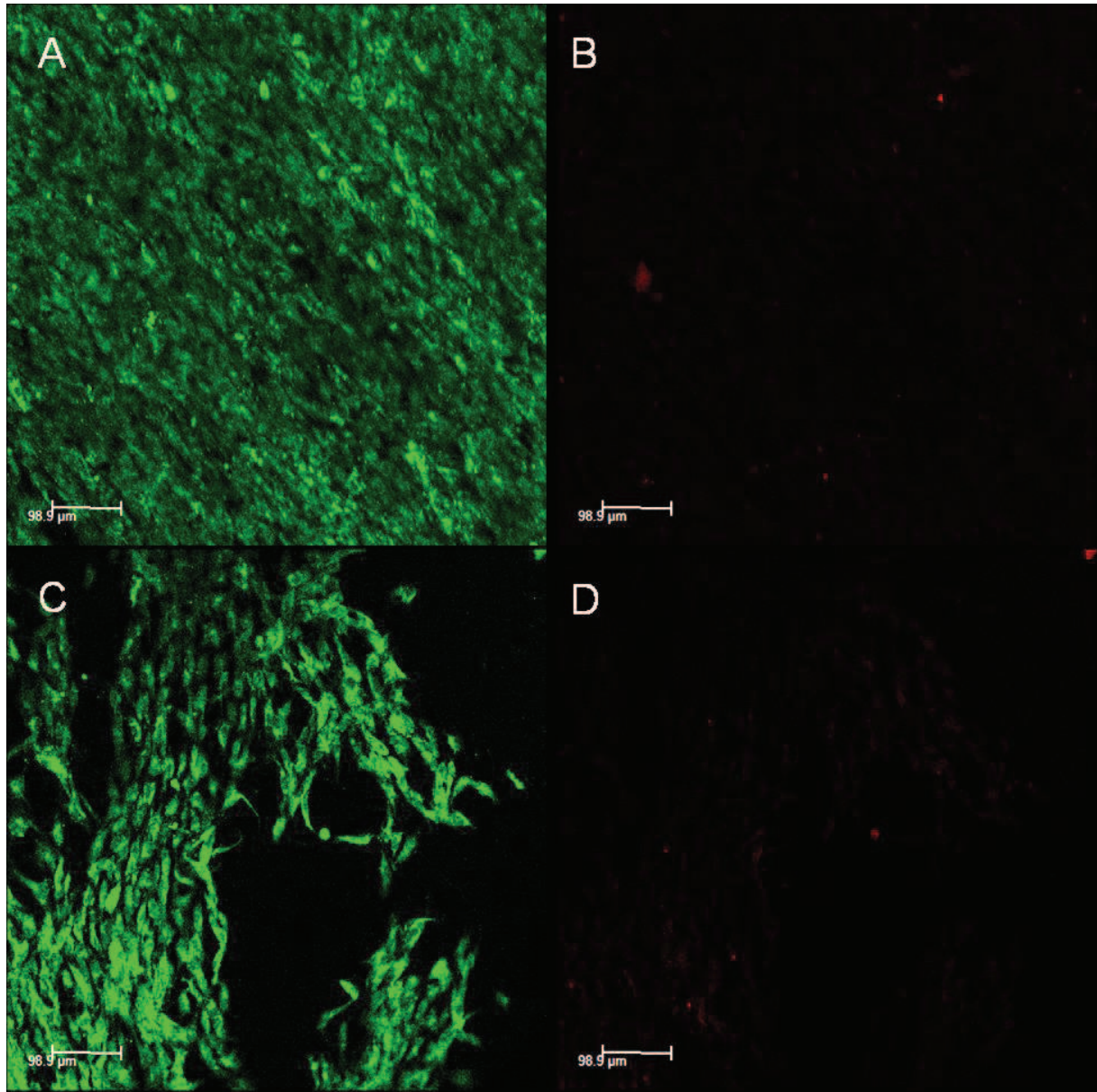


Figure IV-7 : Observation par MCF de cellules C3 après 7 jours de culture sur 94P200 (A, B) et 94T200 (C, D) et marquage Live/Dead – cellules vivantes en vert (A, C) et mortes en rouge (B, D)

2.2. Après mise en forme

Des études ont également été menées sur des CSM en présence des copolymères sous forme textile (fibres seules et matrices) afin d'évaluer les conséquences de cette technique de mise en œuvre sur le comportement cellulaire.

Une étude préliminaire a été réalisée en incubant des cellules C3, exprimant la protéine fluorescente verte eGFP, en présence de microfibrilles extrudées 94P200 ou 94T200. En présence d'une faible quantité de fibres et, par conséquent, d'une faible quantité de matière à laquelle les cellules peuvent adhérer, celles-ci se sont assemblées et ont formé des agrégats dans le milieu de culture et au voisinage des fibres (**Figure IV-8 A et B**). Elles ont ensuite commencé à y adhérer progressivement. Enfin, à partir du 5^{ème} jour de culture, elles ont migré et colonisé la surface des fibres voire formé des réseaux cellulaires dans les espaces interstitiels (**Figure IV-8 C et D**).

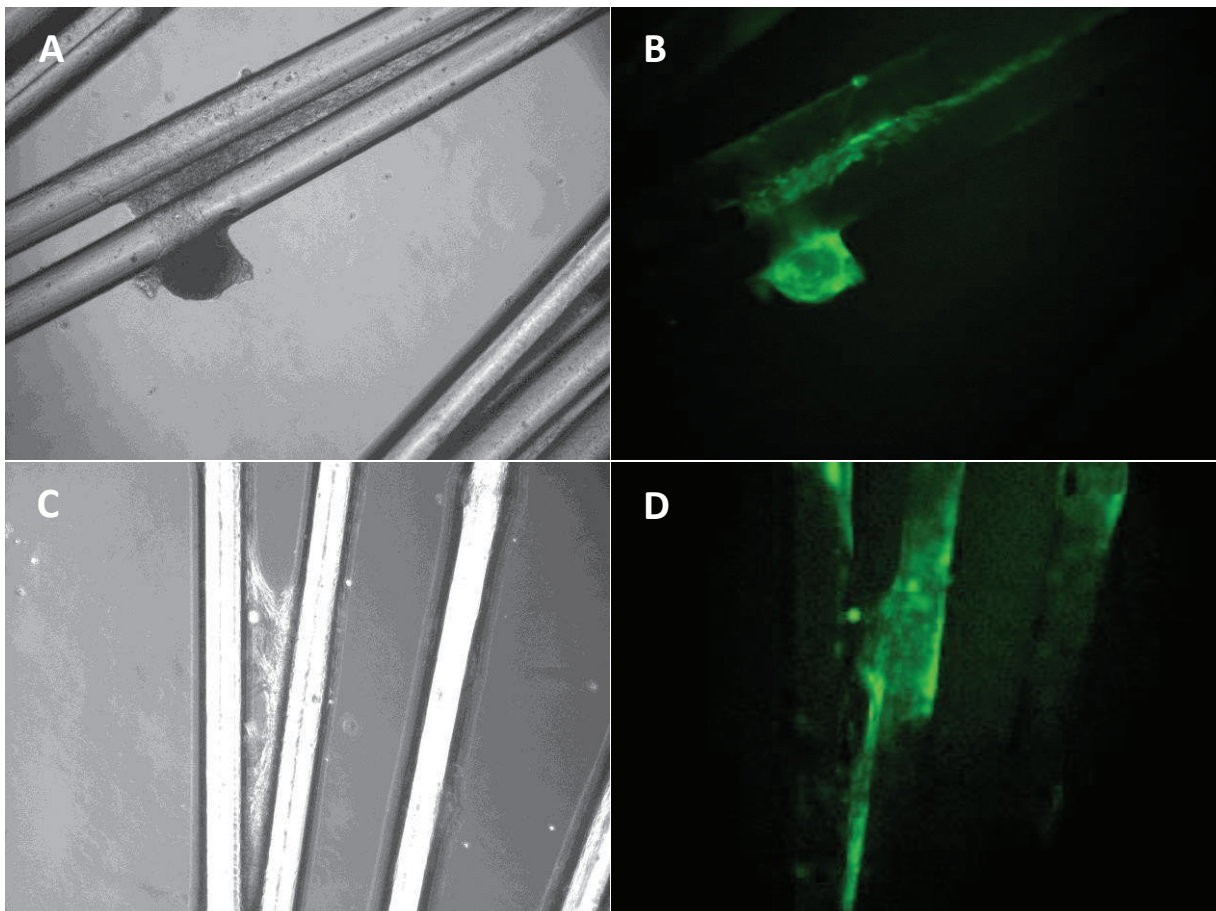


Figure IV-8 : Observation de cellules C3 en présence de microfibrilles par microscopie optique en lumière blanche (A, C) et en fluorescence (B, D)

Ces premiers résultats ont mis en évidence la particularité du comportement des CSM face aux copolymères sous forme de fibres en soulignant la difficulté de faire adhérer ces cellules sur une telle architecture textile. C'est pourquoi un nouveau test de cytocompatibilité a été mis en œuvre en utilisant les matrices textiles obtenues par torsadage et tressage de microfibrilles (94P200 mais aussi 94T200 afin de vérifier que la nature chimique du polymère n'a pas d'influence sur la cytocompatibilité). Après ensemencement des cellules sur ces matrices, un test de prolifération *PrestoBlue* a été réalisé sur 14 jours après différents temps d'incubation. Ce test a révélé une prolifération très limitée pendant les 4 premiers jours de culture (**Figure IV-9 A**). A partir du 7^{ème} et surtout du 10^{ème} jour, il semble en revanche qu'il y ait eu prolifération cellulaire. Si cette prolifération a été équivalente sur les matrices 94P200 et 94T200, elle a en revanche été plus faible que sur le TCPS. Ce temps de latence peut être associé aux difficultés d'adhésion des cellules causées par la forme du support, comme l'a indiqué l'expérience précédente.

Afin de comparer ces résultats à ceux du témoin positif TCPS et dans la mesure où le signal de fluorescence mesuré est proportionnel à la quantité de *PrestoBlue* réduit et, par conséquent, au nombre de cellules vivantes et actives, ce signal de fluorescence mesuré pour chaque échantillon a été rapporté à la surface de prolifération disponible pour les cellules (**Figure IV-9 B**). Dans le cas du contrôle positif TCPS, il s'agit de la surface du puits de culture d'une boîte TC6 (soit 9,4 cm²). Pour les matrices textiles constituées chacune de 30 microfibrilles, une estimation de cette surface a été faite en multipliant par 30 la surface d'une fibre déterminée grâce au diamètre moyen calculé. Bien qu'il s'agisse d'une estimation haute de la surface (le contact entre les fibres rend certaines zones de ces fibres inaccessibles), les résultats rapportés à la surface de prolifération des matrices ont été supérieurs à ceux du TCPS à partir du 10^{ème} jour.

Alors que l'adhésion des cellules sur la structure textile nécessite plusieurs jours avant de permettre une prolifération mesurable, il semblerait donc que l'architecture de ces matrices textiles stimule légèrement la prolifération des CSM et soit un bon support pour la prolifération cellulaire. Cela reste bien sûr une supposition en l'absence de données réellement quantifiables. En revanche, aucune différence significative n'a pu être observée entre les copolymères 94P200 et 94T200. Les propriétés mécaniques restent donc, pour l'instant, l'unique facteur discriminant dans le choix du polymère pour la matrice de régénération.

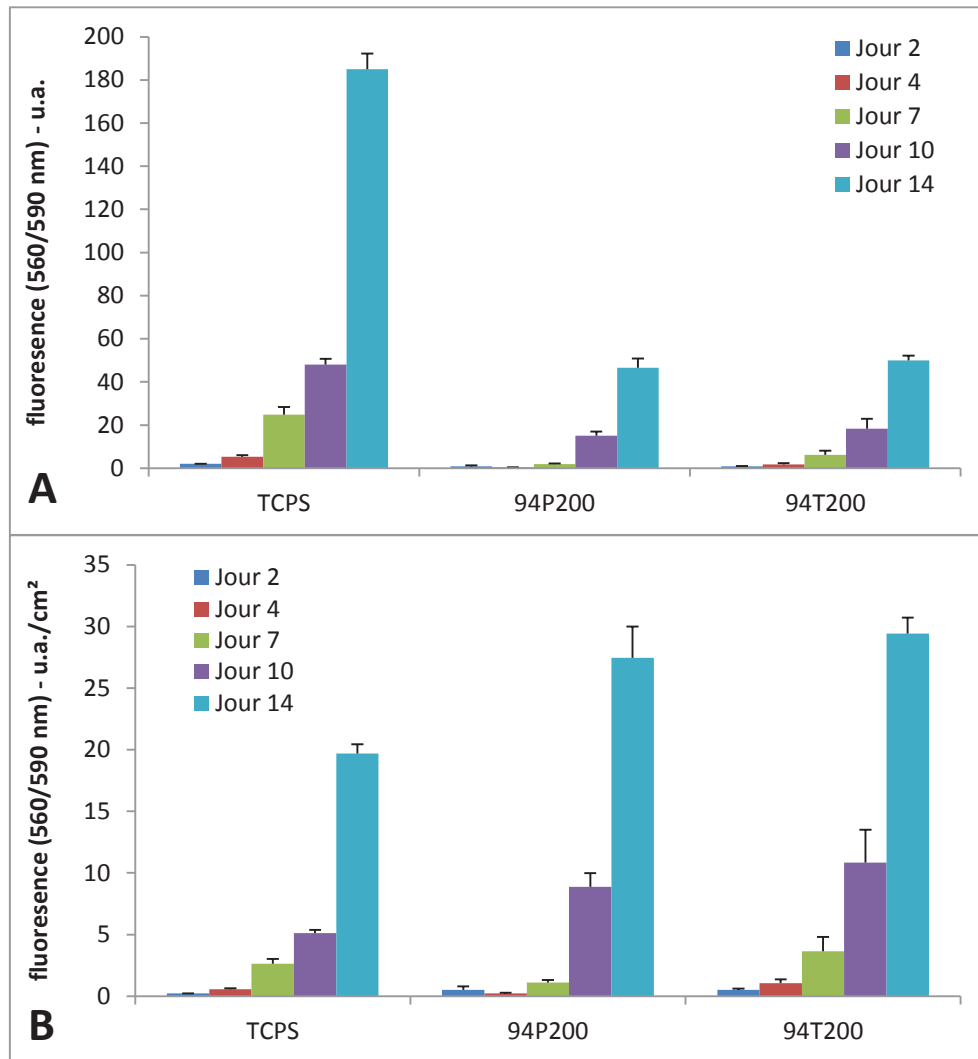


Figure IV-9 : Prolifération *in vitro* des cellules C3 sur les matrices textiles (test PrestoBlue) exprimée en unité arbitraire (A) et en unité arbitraire / cm² (B)

Pour pouvoir observer la colonisation cellulaire des matrices, des cellules C3 ont étéensemencées sur celles-ci puis marquées au Live/Dead après 10 jours de culture et observées en MCF. Malgré la présence de quelques cellules mortes (en rouge, **Figure IV-10 B**), on peut constater qu'un grand nombre de cellules vivantes (en vert, **Figure IV-10 A**) ont recouvert les fibres constituant la matrice. De plus, une reconstitution 3D d'une matrice colonisée obtenue à partir des clichés de MCF (**Figure IV-11**) a suggéré la migration des CSM entre les fibres. Les cellules n'ont donc pas seulement recouvert la surface des fibres mais ont également profité de la structure des matrices textiles et des espaces interstitiels afin de se développer en réseau tridimensionnel. Cette observation pourrait expliquer pourquoi la prolifération semblait plus importante sur ces matrices que sur le contrôle TCPS.

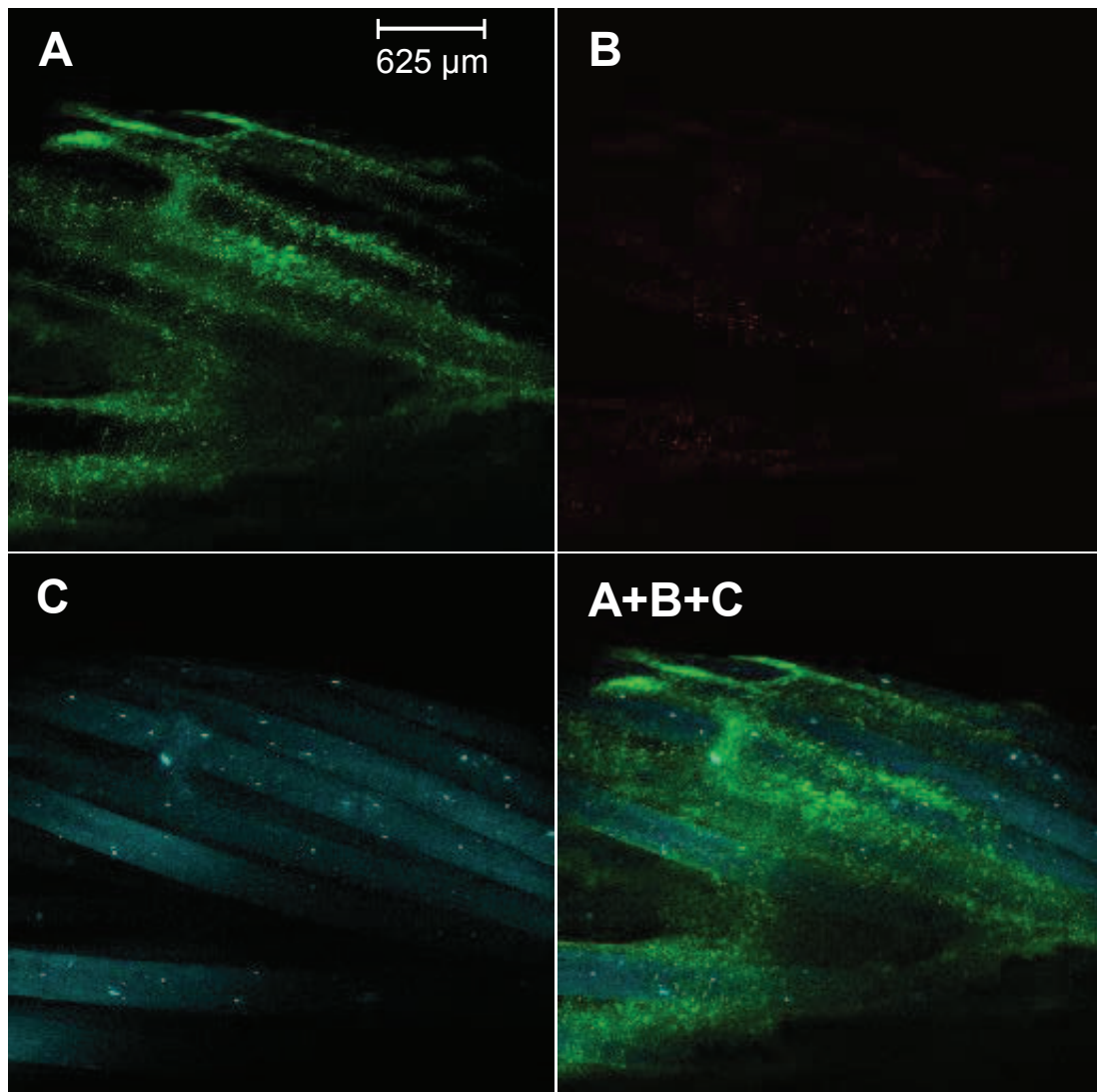


Figure IV-10 : Observation par MCF de cellules C3 après 10 jours de culture sur une matrice textile et marquage Live/Dead – cellules vivantes en vert (A) et mortes en rouge (B), autofluorescence du polymère en bleu (C)

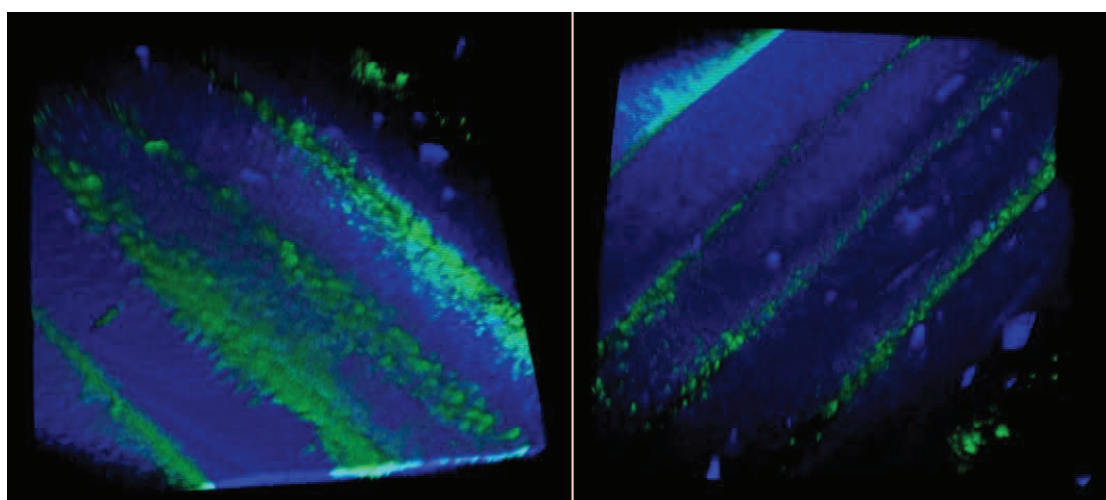


Figure IV-11 : Reconstitution 3D par MCF d'une portion de matrice textile (bleu)ensemencée avec des cellules C3 marquées Live/Dead (vert/rouge)

Pour conclure sur cette étude de cytocompatibilité, nous avons pu vérifier l'absence d'effet toxique de nos copolymères sur les CSM. Ces cellules ont en effet proliféré sur ces biomatériaux et adopté une morphologie fibroblastique. Après la mise en œuvre de ces matériaux et malgré le laps de temps nécessaire à l'adhésion des cellules, leur prolifération a finalement été d'autant plus importante que celles-ci se trouvaient au sein d'une architecture textile leur permettant de s'étendre en un réseau tridimensionnel. Les matrices développées pourraient donc constituer un bon support de régénération ligamentaire, à condition de parvenir à maîtriser la différenciation des CSM.

3. Différenciation cellulaire

3.1. Mise en place du modèle de différenciation

La différenciation de CSM en ligamentocytes ou ténocytes est actuellement relativement mal maîtrisée. S'il existe de nombreuses études de différenciation de CSM cultivées sur des matrices d'ingénierie tissulaire, on trouve assez peu d'informations sur de tels essais pour des CSM cultivées en monocouche. C'est pourquoi, avant de travailler sur les matrices de régénération qui ont été mises au point, nous avons cherché à déterminer des conditions de culture favorables à la différenciation de CSM vers le type cellulaire souhaité.

En se référant aux données de la littérature [282-285], nous avons voulu, dans une première expérience, étudier l'impact de différents facteurs inducteurs, notamment BMP-2 et BMP-12, des facteurs de croissance de la famille TGF- β connus pour être impliqués dans la formation de tissus ligamentaires et tendineux. Pour cela, des cellules C3 ont été cultivées en monocouche et incubées dans différents milieux contenant ces facteurs (BMP-2 pendant 24 heures ou 21 jours, BMP-12 pendant 24 heures ou 21 jours) pour tenter de stimuler la différenciation.

L'observation au microscope des C3 traitées avec BMP-2 (***Figure IV-12 A***) a révélé que les cellules avaient adopté une morphologie plutôt ronde ou ovale, par exemple plus caractéristique de chondrocytes ou d'ostéoblastes que de fibroblastes. Les cellules traitées avec BMP-12 (***Figure IV-12 B***) ont, en revanche, adopté une morphologie fusiforme semblable à celle de fibroblastes.

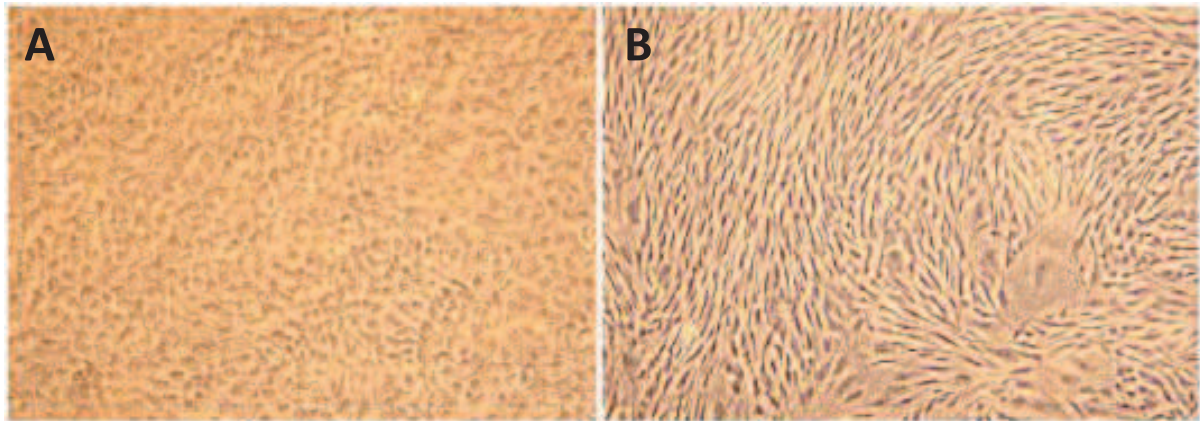


Figure IV-12 : Observation au microscope de cellules C3 traitées BMP-2 (A) et BMP-12 (B)

Afin de caractériser le phénotype des cellules après 21 jours de culture, nous avons réalisé des analyses RT-qPCR sur l'ARNm extrait de ces cellules. Nous avons évalué l'expression de différents gènes sélectionnés, marqueurs de la différenciation ligamentocytaire (**Figure IV-13**). Le premier constat a été que, par rapport aux C3 J₀ (CSM C3 prélevées le jour de l'ensemencement avant induction de la différenciation), aucun traitement n'a stimulé l'expression de scleraxis (Scx), une protéine faisant partie des facteurs de transcription et qui est l'un des rares marqueurs supposé spécifiques des cellules de ligaments et tendons, ni de ténomoduline (Tnmd). L'expression de collagène I (Col I) a été stable et celle des autres marqueurs, collagène III (Col III) et ténascine-C (Tnc), a été induite.

En revanche, si l'on compare l'expression des marqueurs à J₂₁ après les différents traitements inducteurs à celle des C3 sans induction, on note l'augmentation de l'expression de Scx, Tnc et Tnmd après induction par BMP-2 pendant 24 heures ou 21 jours, ainsi que celle de Col III après 24 heures de traitement.

En ce qui concerne les C3 traitées par BMP-12, non seulement il n'y a pas eu de stimulation de l'expression de Scx, mais il n'y en a pas eu non plus (ou très peu comparativement aux C3 J₀ ou aux C3 non traitées) pour Tnc et Tnmd. Bien qu'un traitement au BMP-2 ait induit une augmentation de l'expression des marqueurs ligamentocytaires à J₂₁ par rapport aux cellules non traitées, l'expression de certains marqueurs a été équivalente voire réduite par rapport aux C3 J₀, ce qui suggère au mieux un engagement des cellules mais pas une réelle différenciation.

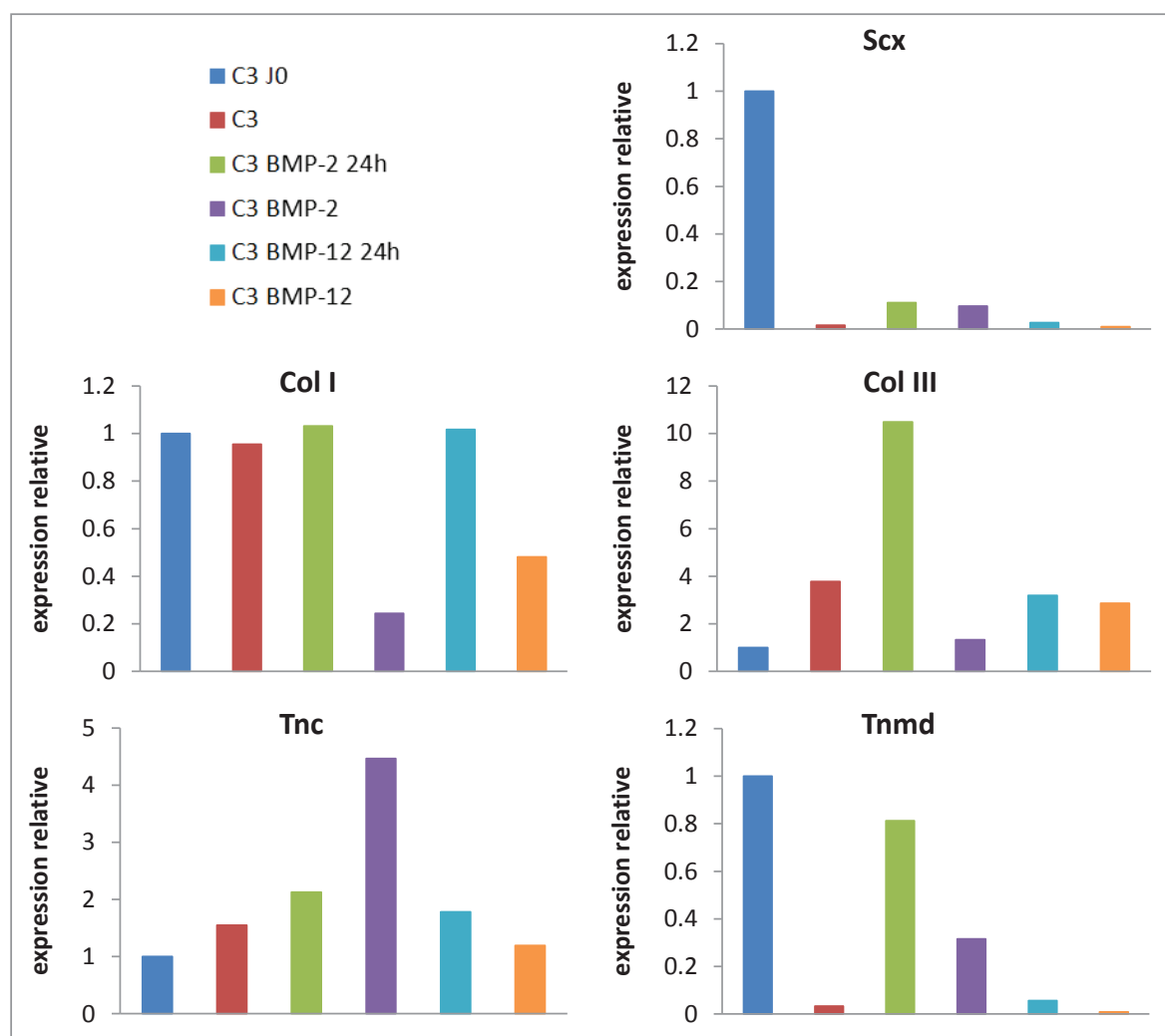


Figure IV-13 : Effets des traitements BMP-2 et BMP-12 sur l'expression par les cellules C3 de marqueurs de différenciation

Utilisés seuls, ni le BMP-2, ni le BMP-12 ne semblent donc avoir induit la différenciation en ligamentocyte. Une seconde expérience de différenciation a donc été mise en place en cultivant les cellules, soit dans du milieu de culture classique (prolifération), soit dans du milieu complet constitué d'acide ascorbique (AA) et de β -glycérophosphate (β -GP), facteurs également connus pour favoriser la prolifération des cellules, la production de MEC et la différenciation vers le ligament [151, 186, 284]. L'expérience a de nouveau été menée sur les C3 mais aussi sur des cellules primaires B6 afin d'étudier leurs différences de comportement face à ce milieu de différenciation. De plus, dans le but d'étudier la cinétique de différenciation, l'expression des gènes marqueurs a été évaluée après 7, 14, 21 et 28 jours de culture.

Les résultats obtenus (**Figure IV-14**) ont effectivement mis évidence des différences dans les réponses cellulaires à cette stimulation biochimique. Tout d'abord, nous avons pu constater un effet globalement positif de ce milieu de différenciation sur les cellules C3. Une expression bien plus élevée qu'avec les C3 en condition de prolifération a en effet été constatée pour plusieurs marqueurs, principalement Col I, Tnc et Tnmd. L'expression de Col III, élevée dans les deux cas, a été plus précoce avec le traitement AA + β -GP. L'expression de Scx, en revanche, n'a pas été modifiée par le traitement. La forte expression de Col I, Col III et Tnc est particulièrement intéressante dans la mesure où ces trois marqueurs sont impliqués dans la formation de MEC du ligament. De plus, l'expression élevée de Col III par rapport au Col I (expression augmentée près de 100 fois pour Col III et 30 fois pour Col I) est connue pour favoriser la formation de tissu ligamentaire ou tendineux [184].

En ce qui concerne les cellules B6, l'effet a, au contraire, été plutôt négatif. Exception faite du Col III (expressions similaires en milieu de prolifération et en milieu de différenciation), l'expression de tous les marqueurs a été plus faible avec le traitement AA + β -GP. Étonnamment, les B6 non traitées ont présenté des taux d'expression relativement élevés de Scx, Col I et Tnmd.

Si l'on compare les deux types cellulaires étudiés, nous pouvons tout d'abord conclure que le traitement AA + β -GP a permis l'augmentation de tous les marqueurs du ligament dans les cellules C3 (exception faite de Scx), alors que pour les B6, l'augmentation est généralement plus faible et inférieure à celle observée en milieu de prolifération. En outre, on constate que l'augmentation des marqueurs a atteint un pic à J₇ pour les C3 et les B6 en milieu inducteur. En milieu de prolifération, ce pic est plus faible et décalé à J₁₄ pour les C3 et les B6 (sauf Col III et Tnmd).

Avec le Col I, Tnmd est toutefois l'un des marqueurs les moins caractéristiques des ligaments parmi ceux que nous avons étudiés. Le résultat le plus surprenant reste celui obtenu pour Scx avec les B6. Bien que ce marqueur soit certainement le plus caractéristique de la différenciation ligamentocytaire, l'augmentation de l'expression de ce gène ne peut, à elle seule, signifier la différenciation (sans facteur stimulant) vers ce type cellulaire. Pour la suite des expériences, nous avons donc conservé les cellules C3 et le milieu complet AA + β -GP pour tester la différenciation sur les matrices textiles.

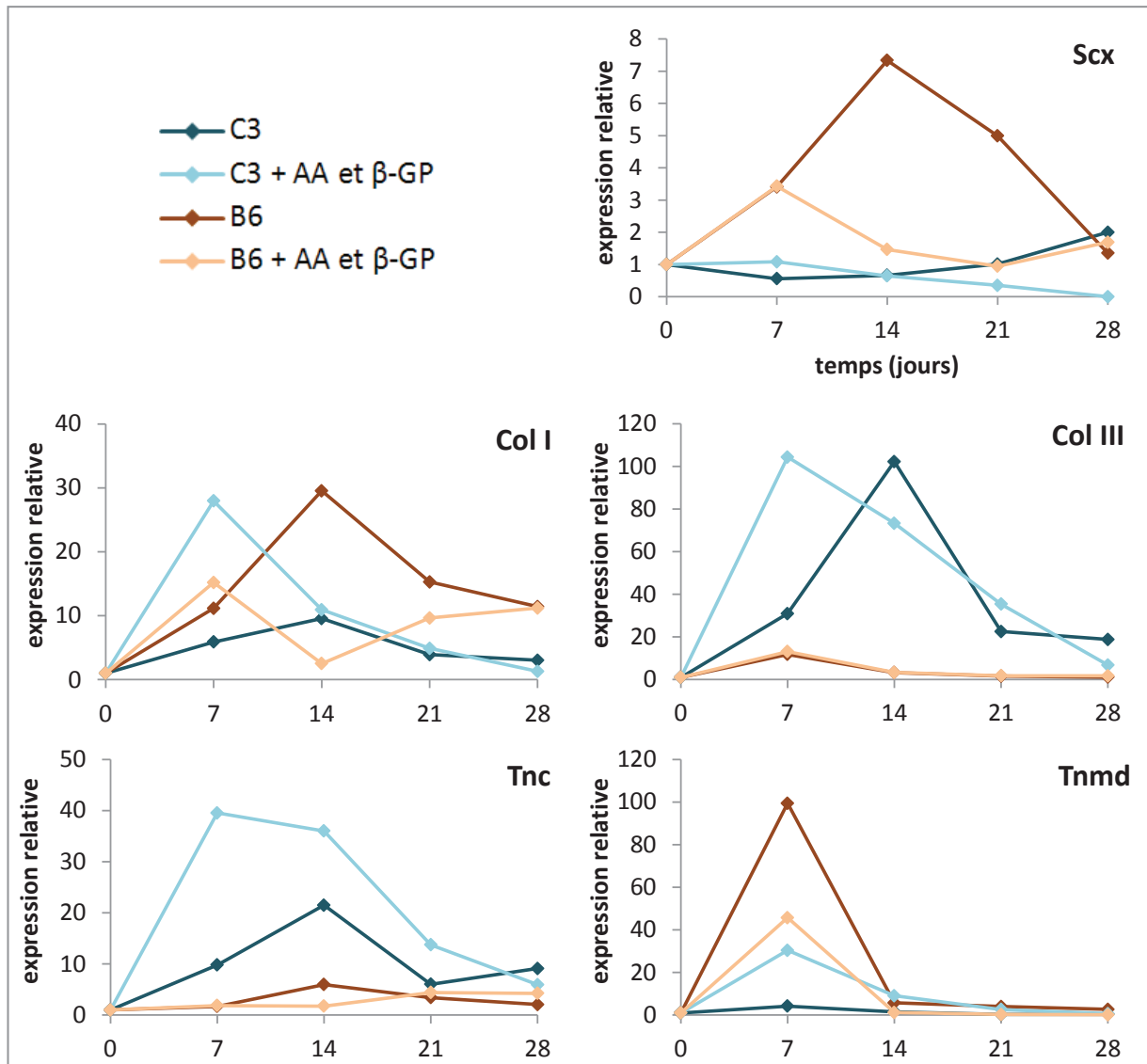


Figure IV-14 : Effets du traitement AA + β -GP sur l'expression des marqueurs de différenciation par les cellules C3 et B6

Avant de procéder aux tests de différenciation sur les matrices textiles, nous avons voulu tester une dernière condition de culture : la densité d'ensemencement des cellules. Nous avons pour cela comparé une nouvelle fois l'efficacité des conditions de différenciation (traitement AA + β -GP) sur des cellules C3 en utilisant deux densités d'ensemencement différentes (16 000 et 80 000 cellules par puits TC24). Comme cela a été suggéré dans plusieurs études [286, 287], cette expérience nous a permis de constater que l'effet inducteur du traitement sur l'expression des marqueurs étudiés est effectivement dépendant de la densité d'ensemencement (*Figure IV-15*).

Tout d'abord, il faut noter que dans cette expérience, l'augmentation de l'expression des marqueurs est généralement plus faible que dans l'expérience précédente et que le pic d'expression semble décalé à J₁₄ au lieu de J₇. Néanmoins, nous avons observé une même tendance. Quelle que soit la densité d'ensemencement, on note une augmentation de l'expression de certains marqueurs (Col III et Tnc) en milieu de prolifération. Cette augmentation est équivalente lorsque les cellules sont ensemencées à 80 000 cellules par puits en milieu inducteur. En revanche, l'expression des marqueurs Col I, Col III, Tnc et Tnmd est plus élevée lorsque la densité cellulaire initiale est de 16 000.

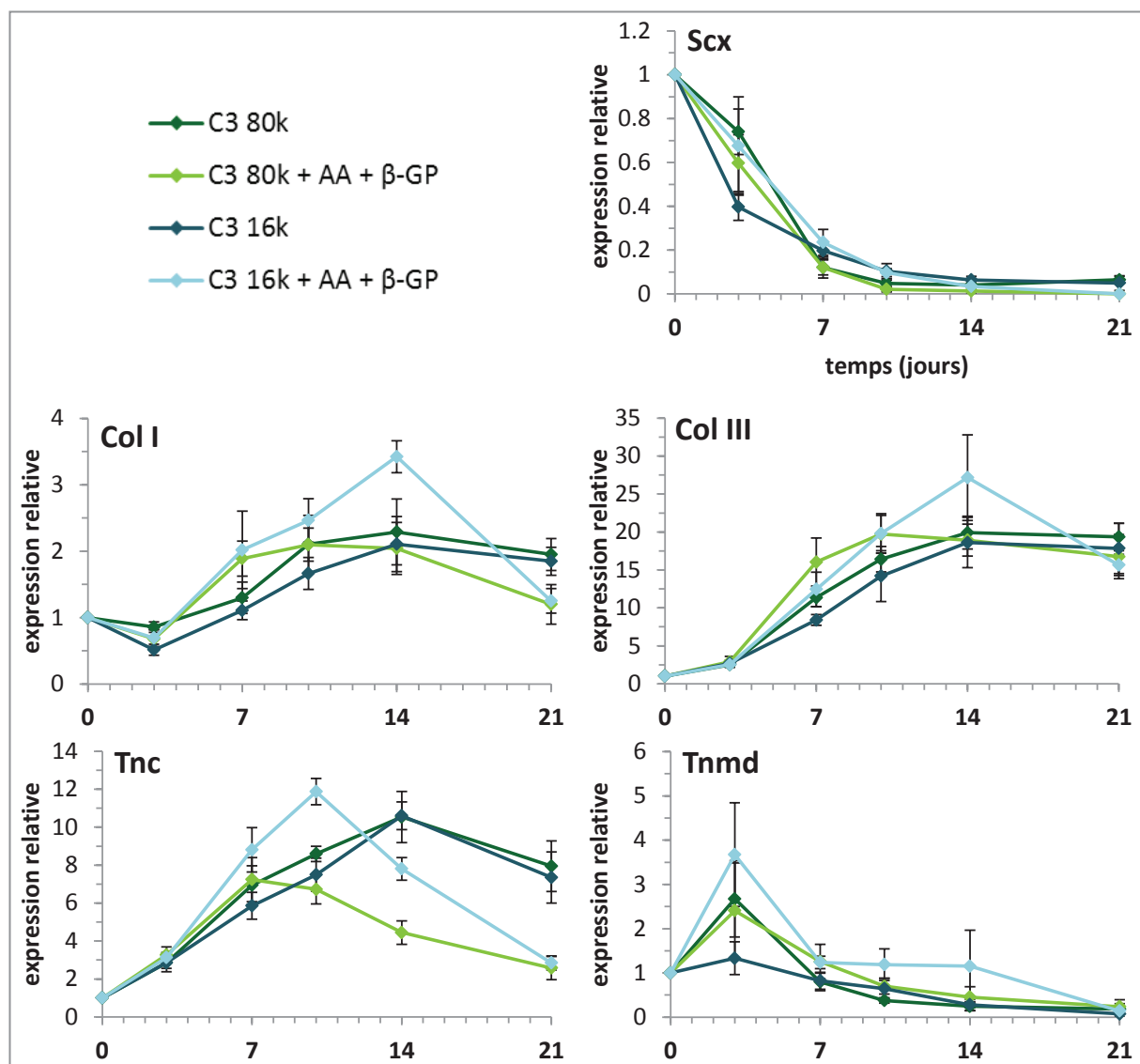


Figure IV-15 : Effets du traitement AA + β -GP et de la densité d'ensemencement sur l'expression des marqueurs de différenciation par les cellules C3

Ces premiers essais de différenciation ont donc permis de déterminer un milieu de culture paraissant favoriser la différenciation ligamentocytaire des CSM. Les tentatives effectuées sur des cellules primaires B6 ont été peu concluantes. En revanche, la lignée C3 dont nous avons largement étudié le comportement en cytocompatibilité, a été beaucoup plus sensible à ce traitement inducteur, en particulier après avoir été ensemencées à une faible densité. Ce sont donc ces cellules qui ont été utilisées dans le cadre des derniers essais menés directement sur les matrices de régénération.

3.2. Différenciation sur les matrices de régénération

Cette expérience de différenciation se découpe en réalité en deux parties : l'évaluation de l'influence du support textile en conditions statiques puis dynamiques. Tout d'abord, en étudiant le comportement des cellules C3 en présence du milieu de différenciation sur TCPS et sur les matrices en conditions statiques avec les différentes densités d'ensemencement, nous avons évalué les effets de la nature du support cellulaire. Les analyses moléculaires ont montré que, quelle que soit la densité cellulaire, l'expression des marqueurs de différenciation était globalement plus faible sur les matrices textiles que sur le TCPS (**Figure IV-16**). Il est en revanche apparu que, conformément à l'expérience précédente, l'expression des marqueurs était légèrement plus élevée avec une densité de 16 000 cellules par échantillon, même sur les matrices. Cela a confirmé le choix des conditions de culture sélectionnées.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une stimulation mécanique cyclique (5 % de déformation puis relaxation, fréquence de 0,5 Hz) appliquée tous les 1 à 2 jours à des matrices textiles ensemencées avec des cellules C3 et maintenues dans des conditions de différenciation. Deux tendances différentes se sont distinguées parmi les profils d'expression des marqueurs de différenciation. L'expression de Col I et Col III, marqueurs liés à la synthèse de MEC, est restée très limitée (presque identique au J_0 pour Col I, augmentée près de 9 fois pour Col III), en tout cas inférieure aux autres échantillons, notamment aux matrices non stimulées. Ce phénomène a également été décrit dans certaines études [137, 208, 211, 212] qui évoquent parfois un schéma de développement cellulaire similaire à celui observé lors de la cicatrisation de ligaments endommagés.

En revanche, si l'expression de Tnmd a été à peine plus forte après stimulation mécanique que sur le TCPS, on a observé une expression bien plus importante de Tnc (augmentée 34 fois contre 19 au maximum pour les autres échantillons) et de Scx (augmentée 1,3 fois tandis que l'expression a systématiquement diminué pour les autres échantillons) sur les matrices stimulées. De plus, malgré une importante diminution de l'expression de Scx entre 3 et 7 jours, une seconde augmentation semble avoir été initiée à partir du 7^{ème} jour. Malheureusement, bien que les matrices textiles aient supporté la stimulation mécanique appliquée, un point de faiblesse a été créé au niveau de la soudure réalisée afin d'obtenir des boucles. Au fur et à mesure des cycles traction-relaxation, ce point de faiblesse a mené à la rupture de nombreux échantillons, nous contraignant à arrêter l'expérience au 11^{ème} jour. Il est donc impossible de comparer ces échantillons à ceux non stimulés sur des temps plus larges.

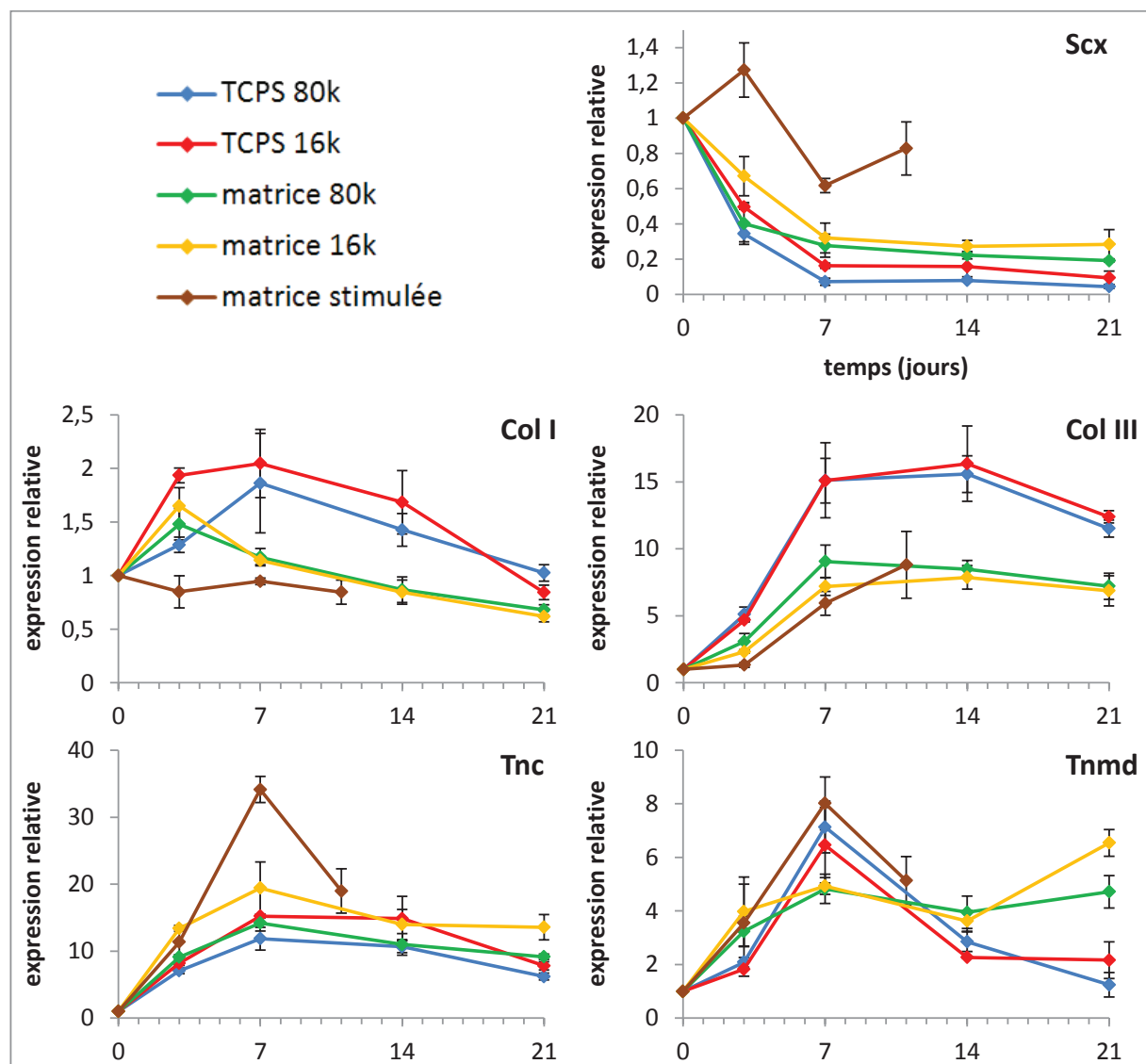


Figure IV-16 : Effets de la densité d'ensemencement, de la nature du support cellulaire et de la stimulation mécanique sur l'expression des marqueurs de différenciation par les cellules C3

Ces résultats obtenus après stimulation mécanique des matrices nous ont paru cohérents compte tenu de certains travaux décrits dans la littérature, notamment ceux faisant également intervenir des procédés de stimulation mécanique. Certains montrent notamment que cette stimulation est supposée induire une expression de Col III et surtout de Col I réellement marquée après 14 voire 21 jours de culture ainsi que de Tnc de manière plus précoce (7 jours) [136, 209, 213]. Pour certains auteurs [209], la régulation positive de ces marqueurs de la MEC ligamentaire serait liée à la transmission des forces mécaniques aux cellules via les sites d'adhésion qui déclencherait leurs récepteurs de surface et l'activation des gènes responsables de la sécrétion constituants de la MEC.

Par ailleurs, une étude menée par Subramony *et al.* sur l'influence de l'alignement des fibres constituant une matrice de régénération et de la stimulation mécanique imposée à ces matrices fibreuses présente de nombreuses similitudes avec la nôtre dans la mesure où l'expression des mêmes gènes a été évaluée lors d'une étude cinétique [212]. Si l'on considère que nos propres matrices s'apparentent à des supports constitués de fibres alignées, on peut constater que nos conditions de stimulation mécanique ont généré des résultats proches des leurs (*Annexe 3*). Sur les matrices non stimulées, les niveaux d'expression de Col I et Col III ont tout d'abord légèrement augmenté avant de redescendre tandis que sur les matrices stimulées, le niveau d'expression de Col I est resté relativement constant (même après 28 jours) et la forte augmentation de l'expression de Col III ne s'est déclarée qu'à partir de 14^{ème} jour. En ce qui concerne Tnc, l'expression est restée constante en l'absence de stimulation mais a fortement augmenté à partir du 14^{ème} jour sous stimulation. Contrairement à nos propres échantillons, il n'a cependant pas été observé de diminution par la suite. En revanche, l'augmentation du niveau d'expression de Tnmd (protéine induite par Scx et impliquée dans l'organisation du collagène) que nous avons obtenue n'a pas été constatée lors de cette étude, que ce soit avec ou sans stimulation mécanique. Enfin, en ce qui concerne le marqueur le plus caractéristique de la différenciation ligamentaire, Scx, ces travaux ont montré, comme dans notre cas, que le niveau d'expression diminue dès le 7^{ème} jour en l'absence de stimulation. En revanche, les auteurs ont constaté une expression presque constante (voire en très légère augmentation) lors de l'application de la stimulation. C'est également uniquement dans cette situation que nous avons observé une augmentation de l'expression de Scx. Les résultats et les conclusions de cet article tendent donc à nous conforter dans le sentiment que nos propres résultats indiquent bien une différenciation ligamentaire ou tout du moins une orientation phénotypique de nos CSM par stimulation mécanique.

A la lumière de ces résultats préliminaires, la stimulation mécanique semble donc avoir eu un impact, en particulier sur l'expression de Scx, le marqueur le plus caractéristique de la différenciation ligamentocytaire. Réalisée sans bioréacteur mais à l'aide d'un dispositif relativement simple, la stimulation mécanique semble donc avoir favorisé la différenciation des cellulesensemencées sur les matrices textiles dont la structure a joué son rôle de support mécanique. Seul le système d'attache a généré une faiblesse et causé la rupture des échantillons. Ces premiers résultats sont donc très encourageants mais des analyses supplémentaires, notamment sur des temps de culture plus longs, seront bien sûr nécessaires afin de les confirmer et de les compléter.

4. Conclusions

L'objectif des travaux décrits dans ce chapitre a été de mettre au point, à partir des copolymères thermoplastiques étudiés et sélectionnés pour leurs propriétés, une matrice de régénération ligamentaire. Le développement d'une architecture textile à partir de microfibrilles extrudées a conduit à la fabrication d'un prototype de matrice dont les propriétés mécaniques ont constitué un réel progrès par rapport à la mise en œuvre par moulage. L'agencement des fibres a non seulement permis de se rapprocher des propriétés d'un LCA, mais a aussi abouti à une structure capable de supporter une centaine de cycles de traction-relaxation. Bien que ces prototypes n'aient pas été préparés grâce à des moyens industriels et qu'il ne s'agisse pas d'une mise en forme optimisée et définitive, ces matrices ont présenté des caractéristiques suffisamment intéressantes pour les envisager comme support d'ingénierie tissulaire et poursuivre le projet avec les aspects biologiques.

La vérification de la cytocompatibilité de ces matrices avec des CSM était une étape indispensable avant de procéder à des tests de différenciation. En ce qui concerne ce critère, nos produits ont parfaitement répondu à nos attentes. L'ensemencement de CSM sur des films de copolymères a montré que, non seulement ces cellules étaient viables, mais aussi qu'elles avaient proliféré après adhésion en adoptant une morphologie cellulaire de type fibroblastique traduisant une excellente compatibilité avec les matériaux. Les tests réalisés sur les matrices textiles ont indiqué une colonisation au moins aussi efficace que sur le TCPS. En dépit de l'utilisation d'un polymère hydrophobe comme le PLA dans nos formulations, les matrices de régénération que nous avons préparées sont apparues comme d'excellents supports potentiels dans le cadre d'une régénération ligamentaire.

L'étude de la différenciation des CSM a été la dernière étape de ce projet. De nombreuses expériences visant à mieux maîtriser la différenciation ligamentocytaire des cellules ont été menées en monocouche avant de pouvoir travailler directement sur les matrices. Grâce à ces études, un certain nombre de paramètres favorisant la différenciation ont été fixés (facteurs inducteurs, type cellulaire, densité d'ensemencement). Enfin, avec l'établissement de ces conditions de différenciation, le test reposant sur une stimulation mécanique relativement simple des matrices ensemencées a conduit à des résultats encourageants puisque même sur une durée assez courte de 11 jours, les cellules ont montré une expression augmentée de certains facteurs de différenciation. Le gène *Scx*, considéré comme le plus caractéristique de la différenciation ligamentocytaire, a d'ailleurs été l'un de ceux dont l'expression a été la plus favorisée.

Face à la multitude de paramètres rentrant en compte aussi bien dans la conception de la matrice que dans la maîtrise de la différenciation cellulaire, nous sommes parvenus, d'une part, à mettre au point un prototype viable de matrice de régénération et, d'autre part, à stimuler la différenciation de CSM ensemencées sur ces matrices. Bien qu'il reste encore de nombreux travaux à mener, ces expériences nous ont fourni des résultats encourageants et montré que la voie choisie était prometteuse.

**CONCLUSIONS GENERALES ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

En raison de la multiplication du nombre de personnes victimes de traumatismes des ligaments ou des tendons et plus particulièrement du LCA, la rupture de ce ligament au rôle clé au sein du genou est devenue un problème de santé publique, ce qui a poussé la communauté scientifique et médicale à une prise de conscience sur l'importance de ce sujet. Au cours des années 1980-90, l'avènement des biomatériaux a donné lieu au développement de nombreuses prothèses synthétiques définitives. Malheureusement, le manque de recul sur le devenir de ces prothèses à long terme et la méconnaissance des propriétés biomécaniques des ligaments ont alors conduit à ce qui est aujourd'hui considéré par de nombreux chirurgiens comme un échec et à un abandon presque total de cette stratégie.

Avec l'arrivée récente de l'ingénierie tissulaire, les chercheurs se sont lancés à la poursuite d'alternatives aux solutions chirurgicales actuelles. En ayant pour but la régénération du tissu lésé en associant les connaissances en matériaux pour développer des matrices dégradables, véritables guides de régénération tissulaire, aux connaissances en biologie cellulaire pour maîtriser la colonisation et la prolifération de cellules souches, l'ingénierie tissulaire du ligament est une technique aux objectifs ambitieux.

C'est en souhaitant s'impliquer dans cette thématique que nos deux laboratoires ont décidé de donner naissance à ce projet qui a constitué le sujet de ma thèse de doctorat. Notre objectif a été à la fois de synthétiser des nouveaux matériaux présentant des propriétés intéressantes pour la conception d'une matrice ligamentaire, de développer une telle matrice textile à partir des polymères les plus prometteurs et de l'utiliser en association avec des cellules souches pour aboutir à la formation de tissus ligamentaires.

La première étape de ce projet a été la **conception des matériaux polymères dégradables**. Pour cela, plusieurs stratégies ont été développées. Nous avons tout d'abord synthétisé des **copolymères thermoplastiques** relativement classiques dans leur structure mais originaux dans leur application. En effet, l'association de PLA avec le Pluronic ou le Tetronic (copolymères de PEG et de PPG) n'avait encore jamais été appliquée à l'ingénierie tissulaire du ligament.

Parmi les diverses formulations testées, les caractérisations et tout particulièrement l'étude de dégradation *in vitro* de 7 semaines ont permis de réduire notre sélection à deux copolymères constitués de PLA₉₄ et de masse molaire de 200 kg/mol. Ces produits se sont en effet démarqués grâce à la faible évolution de leurs propriétés au cours de leur immersion dans du tampon PBS, qu'il s'agisse des propriétés thermiques ou mécaniques. Les valeurs de ces différentes propriétés nous ont par ailleurs permis de les considérer comme potentiellement adaptés à notre application ligamentaire en gardant en perspective la mise en forme finale qu'il serait nécessaire de leur appliquer.

La recherche d'élasticité étant une thématique cruciale dans le cadre de développement de biomatériaux dont on souhaiterait les propriétés mécaniques semblables à celles d'un ligament, la **synthèse de matériaux élastomères** apparaît comme une stratégie évidente et a constitué notre seconde approche. Nous avons tout d'abord obtenu des **structures photoréticulées par voie dite nitrène**. Pour cela, nous avons synthétisé différents agents de réticulation polyazidés capables de réagir sous irradiation UV et de se greffer au squelette carboné de chaînes de PLA. Parmi ces agents, les Pluronic et Tetronic azidés (PA et TA) synthétisés par estérification ont été employés afin d'obtenir des structures chimiques très proches des copolymères thermoplastiques étudiés précédemment en termes de composition, mais sous la forme d'une architecture inédite dans laquelle ces copolymères de PEG et de PPG jouent le rôle de réticulant. C'est à partir de ces deux agents de réticulation, en particulier le TA, que les meilleurs résultats ont été obtenus. Cependant, malgré une réticulation et l'obtention de fractions de gel s'élevant à près de 30 %, les caractérisations des structures réticulées n'ont pas mis en évidence de modification des propriétés thermiques ou d'amélioration des propriétés mécaniques (notamment de l'élasticité) significatives par rapport aux propriétés des thermoplastiques de hautes masses molaires. Bien que, sur cet aspect, les objectifs n'aient pas été atteints, les travaux réalisés ont ouvert la voie à une nouvelle stratégie de réticulation de polymères dégradables. Il serait intéressant de mener des études plus approfondies afin d'optimiser ce procédé, notamment en travaillant sur la nature chimique des agents de réticulation et leur fonctionnalité. Nous avons constaté de manière logique que la réticulation obtenue était d'autant plus importante que l'agent était porteur de plusieurs groupements azoture. De plus, en employant directement des polymères dégradables (PLA, PCL, PGA, etc) de haute fonctionnalité (par exemple des polymères en étoile) comme agents de réticulation, il pourrait être possible de créer de nouveaux types de structures de copolymères à blocs réticulés chimiquement.

Suite à cette première tentative, nous avons choisi de travailler sur une stratégie de réticulation différente. Au lieu d'employer des agents de réticulation capables de se greffer sur des polymères peu réactifs, nous avons voulu modifier chimiquement un autre polymère dégradable, la PCL, afin de lui apporter une fonctionnalité. Notre choix s'est porté sur le greffage de fonctions propargyle capables de réagir sous irradiation UV avec un agent de réticulation thiolé tétrafonctionnel : il s'agit de la **photoréticulation chimique par voie thiol-*yne***. En employant une méthode d'activation anionique mise au point au sein de notre laboratoire, nous sommes effectivement parvenus à apporter cette fonctionnalité chimique à de la PCL qui a ensuite été mise en présence de l'agent de réticulation thiolé et éventuellement de photoamorceurs. Après irradiation, l'étude de la solubilité, du gonflement et des propriétés thermiques des produits obtenus nous ont cette fois permis de démontrer une importante réticulation des matériaux. Malgré des résultats intéressants en ce qui concerne l'évolution des propriétés mécaniques, il sera là aussi nécessaire d'améliorer le procédé, aussi bien en optimisant la réaction de greffage du propargyle qu'en étudiant les conditions de la réaction de réticulation (notamment les quantités de polymère et d'agent de réticulation dans le matériau).

A l'issue des différentes approches étudiées, nous avons décidé de poursuivre nos recherches sur les copolymères thermoplastiques. Ce sont en effet ces polymères qui ont montré les résultats les plus proches de ce qui était recherché dans l'optique du développement d'une matrice ligamentaire. Leur nature thermoplastique fait par ailleurs d'eux des polymères dont la mise en œuvre est en théorie particulièrement aisée. C'est pourquoi nous avons procédé à la **conception de la matrice de régénération** en deux étapes. Les polymères ont tout d'abord été extrudés grâce à un dispositif permettant d'obtenir des microfibrilles puis des supports textiles ont été préparés par une association de torsadage et de tressage de ces microfibrilles. Les matrices ainsi obtenues ont alors été caractérisées et ont montré des propriétés mécaniques particulièrement intéressantes comparativement à celles d'un LCA. Rigidité, résistance à la traction et même tenue à des sollicitations mécaniques cycliques, toutes les propriétés évaluées se sont révélées être en adéquation avec notre cahier des charges initial.

L'étude des **aspects biologiques** du sujet a constitué la dernière étape de notre projet. La **biocompatibilité** figurant parmi les impératifs de tout biomatériau ou dispositif médical implantable, nous avons tout d'abord procédé à des tests de colonisation et de prolifération cellulaires de CSM sur nos matériaux. Tous les tests réalisés ont démontré une excellente

cytocompatibilité de nos produits avec les CSM, que ce soit avant ou après la mise en forme textile. Toutes les exigences vis-à-vis de la matrice de régénération étant alors réunies, nous avons finalement pu travailler sur la différenciation ligamentocytaire de ces CSM. Après une étape de mise au point du modèle de différenciation en monocouche sur plastique, nous avons sélectionné un milieu de culture semblant favoriser la différenciation vers le type cellulaire souhaité puis nous avons finalementensemencé des CSM dans ces conditions inductrices sur nos matrices de régénération. Grâce à un procédé de stimulation mécanique cyclique relativement simple ne nécessitant pas l'emploi d'un bioréacteur, nous sommes alors parvenus à démontrer qu'il était possible d'induire l'orientation phénotypique voire la différenciation des CSM vers le type ligamentocytaire. L'analyse de l'expression de différents marqueurs de différenciation, et notamment de Scleraxis, réalisée par RT-qPCR a en effet révélé une régulation positive des marqueurs caractéristiques de ce phénotype. Ces résultats préliminaires sont très encourageants mais restent cependant à confirmer dans un plus grand nombre d'expérimentations.

Outre les travaux envisageables évoqués plus tôt en ce qui concerne le développement des élastomères dégradables, les études encore nécessaires et les perspectives sont nombreuses. L'importance de la notion d'élasticité des matériaux a été largement mise en évidence dans ce mémoire. La technique de mise en œuvre textile décrite ici a constitué une première approche qui a permis de démontrer la faisabilité du projet en donnant des résultats très encourageants qui nous ont confortés dans l'idée que nos copolymères représentent une alternative intéressante aux matériaux décrits actuellement dans la littérature et que l'application d'une mise en forme textile plus complexe et plus complète devrait mener à des supports de régénération répondant pleinement au cahier des charges. Pour s'en assurer, il sera évidemment nécessaire d'étudier le comportement mécanique de telles structures à long terme (plusieurs mois) et notamment dans des conditions de dégradation *in vitro* et *in vivo*.

Enfin, en ce qui concerne les travaux sur la différenciation des CSM, malgré les bons résultats obtenus (en particulier avec l'expression de Scleraxis, marqueur le plus caractéristique de la différenciation ligamentocytaire), il sera là encore important de réaliser des études plus approfondies. La différenciation ligamentaire étant une thématique inédite pour nos deux laboratoires et les limites du projet ayant bien évidemment été fixées par la durée de la thèse, les essais de différenciation n'ont en réalité constitué qu'une étude préliminaire.

Ces premiers résultats encourageants obtenus après stimulation mécanique seront à confirmer en optimisant le procédé, notamment la fixation des matrices textiles sur le support ainsi que les conditions de stimulation puisque la littérature souligne leur importance, par exemple en combinant traction et torsion. Il est probable qu'une stratégie à long terme nécessite l'utilisation d'un dispositif de stimulation plus sophistiqué, très certainement d'un bioréacteur. La réalisation de tests de différenciation sur les matrices sur des durées plus importantes sera aussi incontournable afin d'étudier la structure et la qualité du tissu dans le temps, notamment en effectuant des analyses histologiques et immunohistologiques.

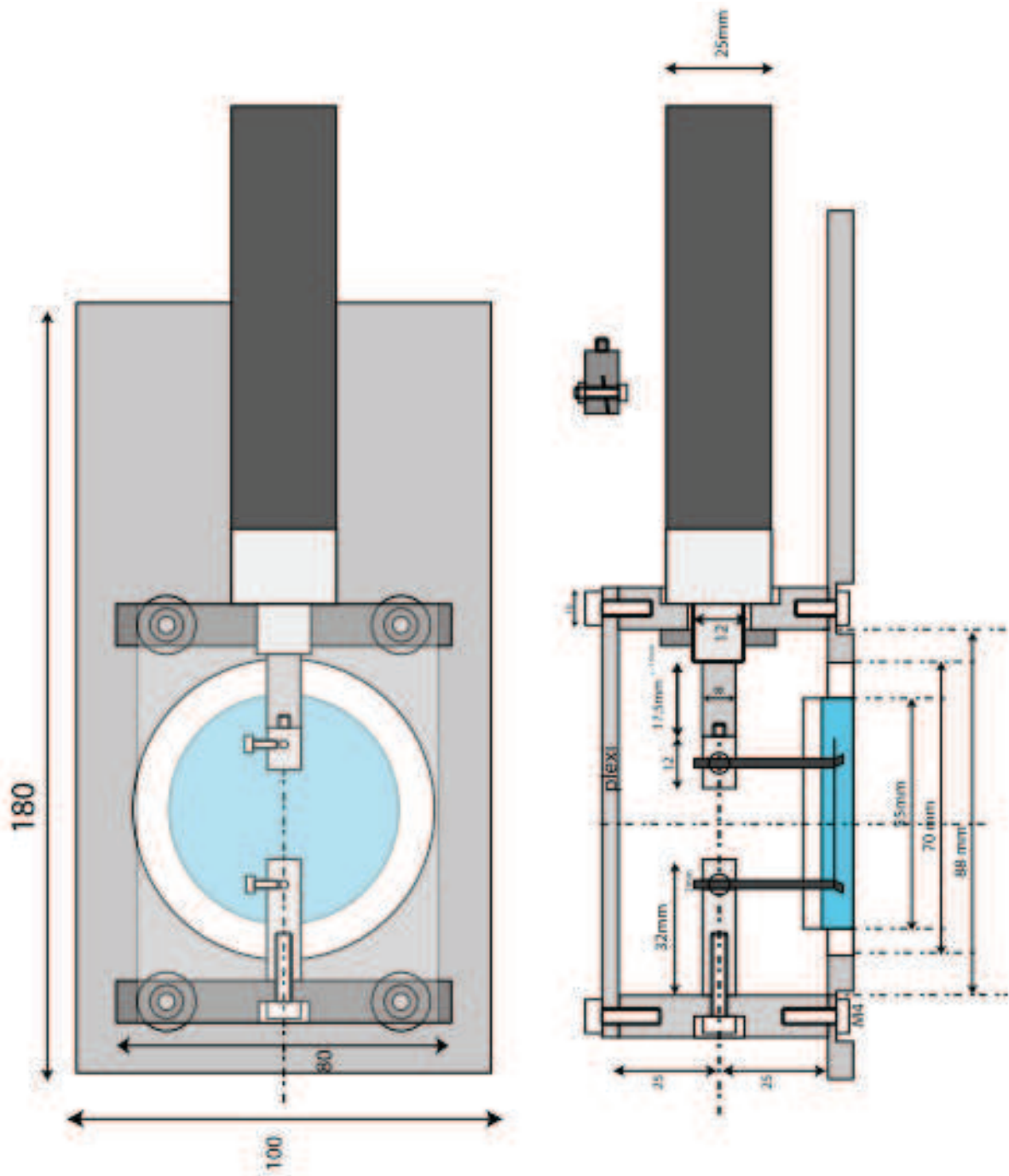
A plus long terme, il sera également indispensable de réaliser des études *in vivo* sur modèle animal, éventuellement en simple implantation sous-cutanée pour étudier l'influence des conditions physiologiques sur les matrices et les cellules, mais surtout lors d'essais de reconstruction du LCA. Des modèles d'expérimentation animale décrits dans la littérature pourraient en effet être appliqués sur le petit animal (rat, lapin) puis sur le gros animal (cochon, mouton) par implantation des matricesensemencées dans des insertions osseuses comme c'est le cas aujourd'hui dans les procédures chirurgicales classiquement utilisées chez l'homme [49, 139, 141, 142, 150, 288].

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Plans CAO du dispositif de stimulation mécanique.....	198
Annexe 2 : Comparaison des propriétés mécaniques du thermoplastique 94P200 et d'élastomères obtenus par voie nitrène et par voie thiol-yne.....	199
Annexe 3 : Expression des marqueurs de différenciation fibroblastiques par des CSM ensemencées sur une matrice de nanofibres alignées avec et sans stimulation mécanique au cours du temps [211].....	200
Annexe 4 : Curriculum vitae	201
Annexe 5 : Liste des communications scientifiques.....	202

Annexe 1 : Plans CAO du dispositif de stimulation mécanique

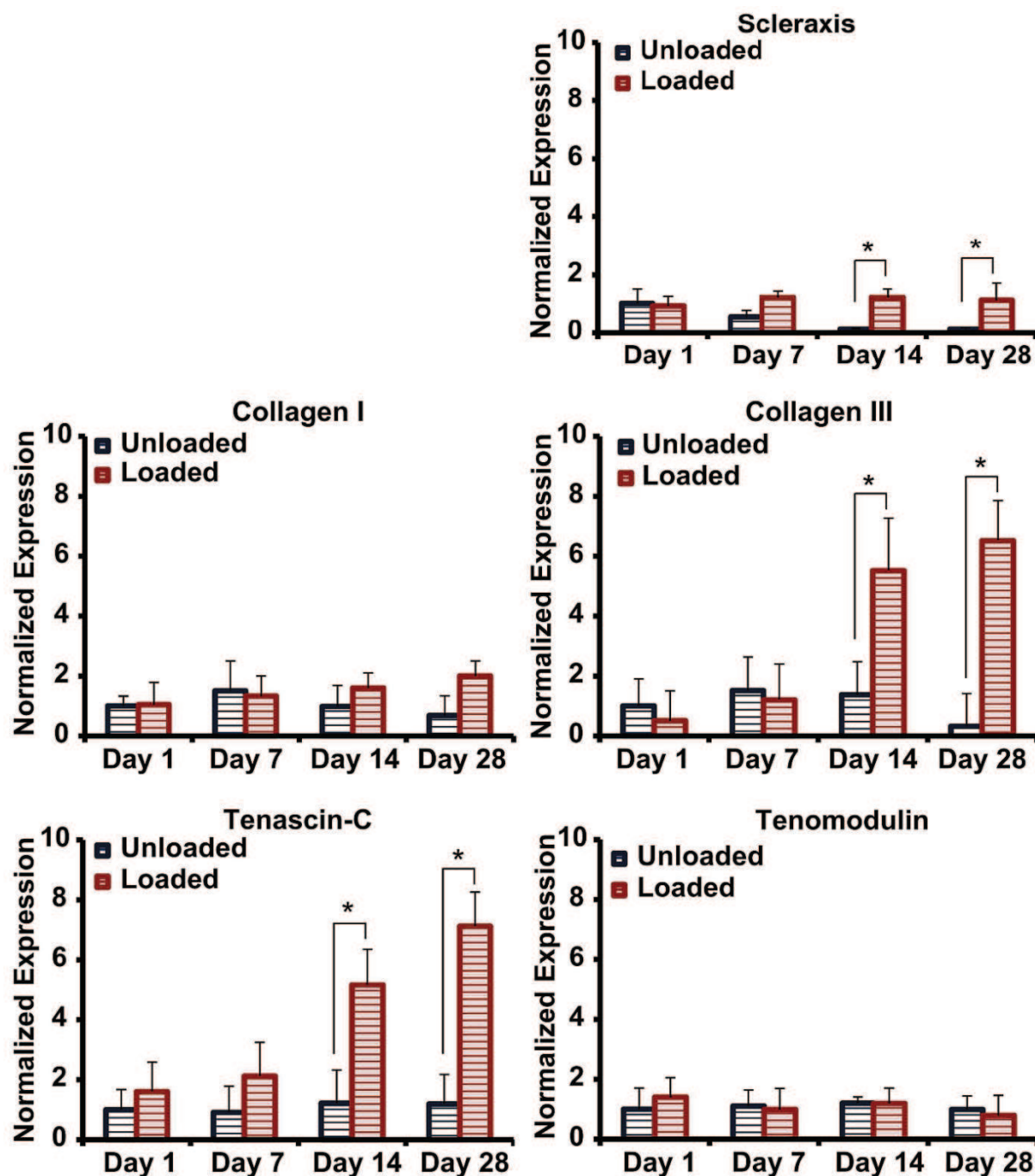


Annexe 2 : Comparaison des propriétés mécaniques du thermoplastique 94P200 et d'élastomères obtenus par voie nitrène et par voie thiol-yne

Polymère	E (MPa)	σ_y (MPa)	ε_y (%)	σ_r (MPa)	ε_r (%)	Fraction de gel (%)
Thermoplastique 94P200	525 +/- 144	12 +/- 1	3,7 +/- 1,7	18 +/- 2	613 +/- 37	x
Elastomère voie nitrène PLA ₉₆ + 40 % de TA	234 +/- 20	5 +/- 2	4,8 +/- 0,8	9 +/- 0	422 +/- 31	10 +/- 2
Elastomère voie thiol-yne 25 % de PCL propargylée ø Irgacure	180 +/- 11	6 +/- 1	4,4 +/- 0,1	9 +/- 1	20 +/- 4	19 +/- 1

Les échantillons dont les propriétés mécaniques sont présentées ici font partie de ceux dont les résultats semblaient les plus intéressants au regard des critères suivants : module d'Young supérieur à celui du LCA et déformation à la limite élastique maximale.

Annexe 3 : Expression des marqueurs de différenciation fibroblastiques par des CSM ensemencées sur une matrice de nanofibres alignées avec et sans stimulation mécanique au cours du temps [212]



*Annexe 4 : Curriculum vitae***Adrien Leroy**

Né le 07/02/1987

Tél. : 06 83 99 37 31

e-mail : leroy.adrien@ymail.com

Formation

2010 / 2013	Doctorat Biologie – Santé <u>Université Montpellier 2 – Sciences et Techniques du Languedoc</u>
2009 / 2010	Master 2 Chimie Organique et Macromoléculaire – spécialité Polymères <u>Université Lille 1 – Sciences et Technologies</u>
2007 / 2010	Diplôme d'ingénieur en Matériaux <u>Polytech'Lille</u>
2005 / 2007	Classe Préparatoire aux Grandes Écoles – filière PCSI / PC <u>Lycée Louis Thuillier – Amiens</u>
2005	Baccalauréat Scientifique spécialité Physique – Chimie (mention Bien)

Compétences

Domaines d'expertise	Synthèse et modification de polymères, caractérisation physique et mécanique des polymères, études de dégradation, biocompatibilité des matériaux, ingénierie tissulaire, veille scientifique
Compétences techniques	Spectroscopies : RMN, IRTF, UV-visible, absorption atomique Microscopies : électronique à balayage (MEB), force atomique (AFM), confocale à fluorescence Analyses thermiques : thermogravimétrie (TGA), enthalpie différentielle (DSC) Analyses mécaniques statiques et dynamiques (DMA, fluage, fatigue), choc Charpy Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) Biologie : culture cellulaire (notamment de cellules souches), RT-qPCR Microbiologie : tests d'activité antibactérienne
Anglais	Lu, écrit, parlé, niveau C1 (score TOEIC : 945 / 990)
Informatique	Microsoft Office : Word, Excel, Powerpoint Initiation à la CFAO (CATIA V5) et à la simulation par éléments finis (ANSYS)

Annexe 5 : Liste des communications scientifiques

Articles

- **A. Leroy**, C. Pinese, C. Bony, X. Garric, D. Noël, B. Nottelet, J. Coudane
Investigation on the properties of Linear PLA-Poloxamer and star PLA-Poloxamine block copolymers for temporary biomedical applications
Materials Science and Engineering C, **2013**, 33 (7)
- A. Harrane, **A. Leroy**, H. Nouailhas, X. Garric, J. Coudane, B. Nottelet
PLA-based biodegradable and tunable soft elastomers for biomedical applications
Biomedical Materials, **2011**, 6 (6)

Communications orales

- **A. Leroy**
Ingénierie tissulaire du ligament : association d'une matrice polymère dégradable et de cellules souches mésenchymateuses
4^{ème} colloque recherche de la Fédération Gay-Lussac, Paris – France, **2013**
Prix de la meilleure communication attribué par la Société Chimique de France
- **A. Leroy**, C. Pinese, C. Bony, X. Garric, D. Noël, J. Coudane, B. Nottelet
Ligament tissue engineering : PLA-based linear and star copolymers scaffolds to promote the differentiation of mesenchymal stem cells
12th International PAT Conference , Berlin – Allemagne, **2013**
Acte de congrès : Polymers for Advanced Technologies, **2013**, 24 (S1)
- **A. Leroy**
Ingénierie tissulaire du ligament : association de nouveaux copolymères dégradables et de cellules souches mésenchymateuses
Journée des Polyméristes Languedociens, Montpellier – France, **2012**
- **A. Leroy**, C. Pinese, C. Bony, X. Garric, D. Noël, B. Nottelet, J. Coudane
Application à l'ingénierie tissulaire du ligament de nouveaux polyesters dégradables associés à des cellules souches mésenchymateuses
12^{ème} journée du GFP-Méditerranée, Marseille – France, **2012**
- **A. Leroy**
PLA-based thermoplastic biodegradable copolymers for ligament tissue engineering : in vitro degradation properties and cytocompatibility
Journées CBS² 2012, Montpellier – France, **2012**

-
- **A. Leroy**, C. Pinese, C. Bony, X. Garric, D. Noël, J. Coudane, B. Nottelet
Thermoset and thermoplastic biodegradable polymers with tunable properties for soft tissue engineering applications
France-Poland seminar on Polymeric Biomaterials for Therapeutic Applications
Montpellier – France, **2011**

Posters

- C. Pinese, **A. Leroy**, C. Bony, D. Noël, B. Nottelet, C. Gagnieu, X. Garric, J. Coudane
New degradable PLA-based block copolymers for soft tissue engineering : cell proliferation and degradation studies
French-Czech Meeting on the Chemistry of Biomolecules, Montpellier – France, **2012**
- Harrane, H. Nouailhas, **A. Leroy**, B. Nottelet, J. Coudane
Thermoset biodegradable elastomers with tunable mechanical properties and degradations
European Polymer Congress, Grenade – Espagne, **2011**
- **Leroy**, A. Harrane, H. Nouailhas, X. Garric, J. Coudane, B. Nottelet
Biodegradable and tunable elastomers for soft tissues biomedical applications
TERMIS -EU Annual Meeting, Grenade - Espagne, **2011**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Smedt, M. D., *Anterior cruciate ligament prosthesis : analysis of a failure*. Acta Orthopaedica Belgica, 1998. **64**(4): p. 422-433.
2. Karmani, S. and Ember, T., *The anterior cruciate ligament--II*. Current Orthopaedics, 2004. **18**(1): p. 49-57.
3. Cournapeau, J., Klouche, S., and Hardy, P., *Material costs of anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring tendons by two different techniques*. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2013. **99**(2): p. 196-201.
4. Cooper, M. T. and Kaeding, C., *Comparison of the Hospital Cost of Autograft Versus Allograft Soft-Tissue Anterior Cruciate Ligament Reconstructions*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2010. **26**(11): p. 1478-1482.
5. Vacanti, J. P. and Langer, R., *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. The Lancet, 1999. **354**, **Supplement 1**(0): p. S32-S34.
6. Langer, R. and Vacanti, J. P., *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
7. Dodds, J. A. and Arnoczky, S. P., *Anatomy of the anterior cruciate ligament: A blueprint for repair and reconstruction*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 1994. **10**(2): p. 132-139.
8. Vunjak-Novakovic, G., Altman, G., Horan, R., and Kaplan, D. L., *Tissue engineering of ligaments*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2004. **6**: p. 131-156.
9. Woo, S. L.-Y., Abramowitch, S. D., Jilger, R., and Liang, R., *Biomechanics of knee ligaments : injury, healing, and repair*. Journal of Biomechanics, 2006. **39**(1): p. 1-20.
10. Goh, J. C.-H., Ouyang, H.-W., Teoh, S.-H., Chan, C. K. C., and Lee, E.-H., *Tissue-Engineering Approach to the Repair and Regeneration of Tendons and Ligaments*. Tissue Engineering, 2003. **9**(supplement 1): p. 31-44.
11. Amiel, D., Frank, C., Harwood, F., Fronek, J., and Akeson, W., *Tendons and ligaments: A morphological and biochemical comparison*. Journal of Orthopaedic Research, 1983. **1**(3): p. 257-265.
12. Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M. A., Borden, M. D., and Cooper, J. A., *Tissue Engineering: Orthopedic Applications*. Annual Review of Biomedical Engineering, 1999. **1**(1): p. 19.
13. Lin, T. W., Cardenas, L., and Soslowky, L. J., *Biomechanics of tendon injury and repair*. Journal of Biomechanics, 2004. **37**(6): p. 865-877.

14. Daniel, D. M., Akeson, W. H., and O'Connor, J. J., *Knee ligaments : structure, function, injury, and repair*. 1990, New York: Raven Press.
15. Doroski, D. M., Brink, K. S., and Temenoff, J. S., *Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament*. *Biomaterials*, 2007. **28**(2): p. 187-202.
16. Benjamin, M., Ralphs, J. R., and Kwang, W. J., *The cell and developmental biology of tendons and ligaments*. *International Review of Cytology*, 2000. **196**: p. 85-130.
17. Rodrigues, M. T., Reis, R. L., and Gomes, M. E., *Engineering tendon and ligament tissues: present developments towards successful clinical products*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2012.
18. Altman, G. H., Horan, R. L., Lu, H. H., Moreau, J., Martin, I., Richmond, J. C., and Kaplan, D. L., *Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments*. *Biomaterials*, 2002. **23**(20): p. 4131-4141.
19. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., *Biologie moléculaire de la cellule*. 5ème édition ed. 2011: Lavoisier.
20. Bächinger, H. P., Mizuno, K., Vranka, J. A., and Boudko, S. P., *5.16 - Collagen Formation and Structure*, in *Comprehensive Natural Products II*, L. Mander and H.-W. Liu, Editors. 2010, Elsevier: Oxford. p. 469-530.
21. Fichard, A., Chanut-Delalande, H., and Ruggiero, F., *Le syndrome d'Ehlers-Danlos : l'architecture matricielle en question*. *Médecine / Sciences*, 2003. **19**(4): p. 443-452.
22. Provenzano, P. P. and Vanderby Jr, R., *Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon*. *Matrix Biology*, 2006. **25**(2): p. 71-84.
23. Stevens, A. and Lowe, J., *Histologie humaine*. 3ème édition ed. 2006: Elsevier Masson.
24. Tandeter, H. B. and Shvartzman, P., *Acute knee injuries: use of decision rules for selective radiograph ordering*. *American Family Physician*, 1999. **60**(9): p. 2599-2608.
25. Goldblatt, J. P. and Richmond, J. C., *Anatomy and biomechanics of the knee*. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 2003. **11**(3): p. 172-186.
26. Zantop, T., Petersen, W., and Fu, F. H., *Anatomy of the anterior cruciate ligament*. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 2005. **15**(1): p. 20-28.
27. Karmani, S. and Ember, T., *The anterior cruciate ligament--I*. *Current Orthopaedics*, 2003. **17**(5): p. 369-377.

28. Duthon, V. B., Barea, C., Abrassart, S., Fasel, J. H., Fritschy, D., and Ménétrey, J., *Anatomy of the anterior cruciate ligament*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2006. **14**(3): p. 204-213.
29. Zantop, T., Petersen, W., Sekiya, J., Musahl, V., and Fu, F., *Anterior cruciate ligament anatomy and function relating to anatomical reconstruction*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2006. **14**(10): p. 982-992.
30. Fromm, B. and Kummer, W., *Nerve supply of anterior cruciate ligaments and of cryopreserved anterior cruciate ligament allografts: a new method for the differentiation of the nervous tissues*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 1994. **2**(2): p. 118-122.
31. Kennedy, J. C., Hawkins, R. J., Willis, R. B., and Danylchuk, K. D., *Tension studies of human knee ligaments*. Journal of Bone & Joint Surgery, 1976. **58**(3): p. 350-355.
32. Noyes, F. R. and Grood, E. S., *The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys*. J Bone Joint Surg Am, 1976. **58**(8): p. 1074-1082.
33. Wang, J. H. C., *Mechanobiology of tendon*. Journal of Biomechanics, 2006. **39**(9): p. 1563-1582.
34. Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H., and Bernstorff, S., *Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen*. Journal of Structural Biology, 1998. **122**(1-2): p. 119-122.
35. Crowninshield, R. D. and Pope, M. H., *The Strength and Failure Characteristics of Rat Medial Collateral Ligaments*. The Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 1976. **16**(2): p. 99-105.
36. Vieira, A. C., Guedes, R. M., and Marques, A. T., *Development of ligament tissue biodegradable devices : a review*. Journal of Biomechanics, 2009. **42**(15): p. 2421-2430.
37. Noyes, F. R., Butler, D. L., Grood, E. S., Zernicke, R. F., and Hefzy, M. S., *Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions*. Journal of Bone & Joint Surgery, 1984. **66**(3): p. 344-352.
38. Wren, T. A. L., Lindsey, D. P., Beaupré, G. S., and Carter, D. R., *Effects of Creep and Cyclic Loading on the Mechanical Properties and Failure of Human Achilles Tendons*. Annals of Biomedical Engineering, 2003. **31**(6): p. 710-717.
39. Kahn, C., *Ingénierie tissulaire des ligaments - Conception d'un bioréacteur et étude des propriétés mécaniques*. 2009, Institut National Polytechnique de Lorraine: Nancy. p. 206.
40. Yin, L. and Elliott, D. M., *A biphasic and transversely isotropic mechanical model for tendon:: application to mouse tail fascicles in uniaxial tension*. Journal of Biomechanics, 2004. **37**(6): p. 907-916.

41. Ciarletta, P., Dario, P., and Micera, S., *Pseudo-hyperelastic model of tendon hysteresis from adaptive recruitment of collagen type I fibrils*. *Biomaterials*, 2008. **29**(6): p. 764-770.
42. Provenzano, P., Lakes, R., Keenan, T., and vanderby, R., Jr., *Nonlinear Ligament Viscoelasticity*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2001. **29**(10): p. 908-914.
43. Abramowitch, S. D. and Woo, S. L. Y., *An Improved Method to Analyze the Stress Relaxation of Ligaments Following a Finite Ramp Time Based on the Quasi-Linear Viscoelastic Theory*. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2004. **126**(1): p. 92-97.
44. Oddou, C. and Pierre, J., *Biomechanical aspects in tissue engineering*. *Clinical Hemorheology & Microcirculation*, 2005. **33**(3): p. 189-195.
45. Ng, G. Y. F., *Ligament Injury and Repair: Current Concepts*. *Hong Kong Physiotherapy Journal*, 2002. **20**(1): p. 22-29.
46. Hauser, R. A., Dolan, E. E., Phillips, H. J., Newlin, A. C., Moore, R. E., and Woldin, B. A., *Ligament Injury and Healing: A Review of Current Clinical Diagnostics and Therapeutics*. *The Open Rehabilitation Journal*, 2013. **6**: p. 1-20.
47. Weitzel, P. P., Richmond, J. C., Altman, G. H., Calabro, T., and Kaplan, D. L., *Future direction of the treatment of ACL ruptures*. *Orthopedic Clinics of North America*, 2002. **33**(4): p. 653-661.
48. Legnani, C., Ventura, A., Terzaghi, C., Borgo, E., and Albisetti, W., *Anterior cruciate ligament reconstruction with synthetic grafts. A review of literature*. *International Orthopaedics*, 2010. **34**(4): p. 465-471.
49. Zhou, J., Manassero, M., Migonney, V., and Viateau, V., *Évaluation clinique et biologique d'un ligament synthétique bioactif chez la brebis*. *IRBM*, 2009. **30**(4): p. 153-155.
50. Berthiaume, F. o., Maguire, T. J., and Yarmush, M. L., *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges*. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011. **2**(1): p. 403-430.
51. Griffith, L. G. and Naughton, G., *Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities*. *Science*, 2002. **295**(5557): p. 1009-1014.
52. O'Brien, F. J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. *Materials Today*, 2011. **14**(3): p. 88-95.
53. Saxena, A. K., *Tissue engineering and regenerative medicine research perspectives for pediatric surgery*. *Pediatric Surgery International*, 2010. **26**(6): p. 557-573.
54. Williams, D. F., *On the nature of biomaterials*. *Biomaterials*, 2009. **30**(30): p. 5897-5909.

55. Rosen, M. J., *Polyester-based mesh for ventral hernia repair: is it safe?* The American Journal of Surgery, 2009. **197**(3): p. 353-359.
56. Caroline, R., *Corrosion et traitements de surface des biomatériaux*. Techniques de l'ingénieur, 2010. **base documentaire : TIB372DUO**(ref. article : cor140).
57. Finch, J., *The ancient origins of prosthetic medicine*. The Lancet, 2011. **377**(9765): p. 548-549.
58. Miyata, T., Taira, T., and Noishiki, Y., *Collagen engineering for biomaterial use*. Clinical Materials, 1992. **9**(3â€“4): p. 139-148.
59. Friess, W., *Collagen - biomaterial for drug delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998. **45**(2): p. 113-136.
60. Müller, F. A., Müller, L., Hofmann, I., Greil, P., Wenzel, M. M., and Staudenmaier, R., *Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(21): p. 3955-3963.
61. Khor, E. and Lim, L. Y., *Implantable applications of chitin and chitosan*. Biomaterials, 2003. **24**(13): p. 2339-2349.
62. Campo, V. L., Kawano, D. F., Silva Jr, D. B. d., and Carvalho, I., *Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review*. Carbohydrate Polymers, 2009. **77**(2): p. 167-180.
63. Hubbell, J. A., *Bioactive biomaterials*. Current Opinion in Biotechnology, 1999. **10**(2): p. 123-129.
64. Karageorgiou, V. and Kaplan, D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-5491.
65. Vert, M., *Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything*. Biomacromolecules, 2004. **6**(2): p. 538-546.
66. Edlund, U. and Albertsson, A. C., *Polyesters based on diacid monomers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(4): p. 585-609.
67. Albertsson, A.-C. and Varma, I. K., *Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications*. Biomacromolecules, 2003. **4**(6): p. 1466-1486.
68. Albertsson, A.-C. and Varma, I. K., *Aliphatic Polyesters: Synthesis, Properties and Applications*, in *Degradable Aliphatic Polyesters*. 2002, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-40.
69. Södergård, A. and Stolt, M., *Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition*. Progress in Polymer Science, 2002. **27**(6): p. 1123-1163.

70. Vert, M., *Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications*. Die Angewandte Makromolekulare Chemie, 1989. **166**(1): p. 155-168.
71. Du, Y. J., Lemstra, P. J., Nijenhuis, A. J., Van Aert, H. A. M., and Bastiaansen, C., *ABA Type Copolymers of Lactide with Poly(ethylene glycol). Kinetic, Mechanistic, and Model Studies*. Macromolecules, 1995. **28**(7): p. 2124-2132.
72. Kricheldorf, H. R., Kreiser-Saunders, I., and Boettcher, C., *Polylactones: 31. Sn(II)octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study*. Polymer, 1995. **36**(6): p. 1253-1259.
73. Dechy-Cabaret, O., Martin-Vaca, B., and Bourissou, D., *Controlled Ring-Opening Polymerization of Lactide and Glycolide*. Chemical Reviews, 2004. **104**(12): p. 6147-6176.
74. Hastings, G. W. and Ducheyne, P., *Macromolecular Biomaterials*. 1984: CRC Press.
75. Saeidlou, S., Huneault, M. A., Li, H., and Park, C. B., *Poly(lactic acid) crystallization*. Progress in Polymer Science, 2012. **37**(12): p. 1657-1677.
76. Dumitriu, S., *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*, ed. C. Press. 2001: Taylor & Francis.
77. Perego, G., Cella, G. D., and Bastioli, C., *Effect of molecular weight and crystallinity on poly(lactic acid) mechanical properties*. Journal of Applied Polymer Science, 1996. **59**(1): p. 37-43.
78. Albertsson, A.-C., Renstad, R., Erlandsson, B., Eldsäter, C., and Karlsson, S., *Effect of processing additives on (bio)degradability of film-blown poly(ϵ -caprolactone)*. Journal of Applied Polymer Science, 1998. **70**(1): p. 61-74.
79. Middleton, J. C. and Tipton, A. J., *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2335-2346.
80. Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., and Boccaccini, A. R., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2006. **27**(18): p. 3413-3431.
81. Li, S., Girard, A. I., Garreau, H., and Vert, M., *Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant d-lactyl contents*. Polymer Degradation and Stability, 2000. **71**(1): p. 61-67.
82. Li, S. M., Garreau, H., and Vert, M., *Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1990. **1**(3): p. 123-130.
83. Li, S., Garreau, H., and Vert, M., *Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1990. **1**(4): p. 198-206.

84. Rashkov, I., Manolova, N., Li, S. M., Espartero, J. L., and Vert, M., *Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Short Poly(l-lactic acid) Chains*. *Macromolecules*, 1996. **29**(1): p. 50-56.
85. Woodruff, M. A. and Hutmacher, D. W., *The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century*. *Progress in Polymer Science*, 2010. **35**(10): p. 1217-1256.
86. Göpferich, A., *Mechanisms of polymer degradation and erosion*. *Biomaterials*, 1996. **17**(2): p. 103-114.
87. Burkersroda, F. v., Schedl, L., and Göpferich, A., *Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion*. *Biomaterials*, 2002. **23**(21): p. 4221-4231.
88. Grizzi, I., Garreau, H., Li, S., and Vert, M., *Hydrolytic degradation of devices based on poly(dl-lactic acid) size-dependence*. *Biomaterials*, 1995. **16**(4): p. 305-311.
89. Hukins, D. W. L., Leahy, J. C., and Mathias, K. J., *Biomaterials: defining the mechanical properties of natural tissues and selection of replacement materials*. *Journal of Materials Chemistry*, 1999. **9**(3): p. 629-636.
90. Koski, J. A., Ibarra, C., and Rodeo, S. A., *Tissue-engineered ligament*. *Tissue Engineering in Orthopedic Surgery*, 2000. **31**(3): p. 437-452.
91. Huang, D., Balian, G., and Chhabra, A. B., *Tendon Tissue Engineering and Gene Transfer: The Future of Surgical Treatment*. *The Journal of Hand Surgery*, 2006. **31**(5): p. 693-704.
92. Koob, T. J., *Biomimetic approaches to tendon repair*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002. **133**(4): p. 1171-1192.
93. Weigel, T., Schinkel, G., and Lendlein, A., *Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering*. *Expert Review of Medical Devices*, 2006. **3**(6): p. 835-851.
94. Yilgor, C., Yilgor Huri, P., and Huri, G., *Tissue Engineering Strategies in Ligament Regeneration*. *Stem Cells International*, 2012. **2012**.
95. Badylak, S. F., Freytes, D. O., and Gilbert, T. W., *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. *Acta Biomaterialia*, 2009. **5**(1): p. 1-13.
96. Chen, J., Xu, J., Wang, A., and Zheng, M., *Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products*. *Expert Review of Medical Devices*, 2008. **6**(1): p. 61-73.
97. Ricchetti, E. T., Aurora, A., Iannotti, J. P., and Derwin, K. A., *Scaffold devices for rotator cuff repair*. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 2012. **21**(2): p. 251-265.

98. Lee, D. K., *A Preliminary Study on the Effects of Acellular Tissue Graft Augmentation in Acute Achilles Tendon Ruptures*. The Journal of Foot and Ankle Surgery, 2008. **47**(1): p. 8-12.
99. Bond, J. L., Dopirak, R. M., Higgins, J., Burns, J., and Snyder, S. J., *Arthroscopic Replacement of Massive, Irreparable Rotator Cuff Tears Using a GraftJacket Allograft: Technique and Preliminary Results*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2008. **24**(4): p. 403.e1-403.e8.
100. Malcarney, H. L., Bonar, F., and Murrell, G. A. C., *Early Inflammatory Reaction After Rotator Cuff Repair With a Porcine Small Intestine Submucosal Implant: A Report of 4 Cases*. The American Journal of Sports Medicine, 2005. **33**(6): p. 907-911.
101. Liang, R., Woo, S. L. Y., Takakura, Y., Moon, D. K., Jia, F., and Abramowitch, S. D., *Long-term effects of porcine small intestine submucosa on the healing of medial collateral ligament: A functional tissue engineering study*. Journal of Orthopaedic Research, 2006. **24**(4): p. 811-819.
102. Liang, R., Woo, S. L. Y., Nguyen, T. D., Liu, P.-C., and Almarza, A., *Effects of a bioscaffold on collagen fibrillogenesis in healing medial collateral ligament in rabbits*. Journal of Orthopaedic Research, 2008. **26**(8): p. 1098-1104.
103. Lee, A. J., Chung, W.-H., Kim, D.-H., Lee, K.-P., Chung, D.-J., Do, S. H., and Kim, H.-Y., *Anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model using canine small intestinal submucosa and autologous platelet-rich plasma*. Journal of Surgical Research, 2012. **178**(1): p. 206-215.
104. Badylak, S., Arnoczky, S., Plouhar, P., Haut, R., Mendenhall, V., Clarke, R., and Horvath, C., *Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S333-S343.
105. Zheng, M. H., Chen, J., Kirilak, Y., Willers, C., Xu, J., and Wood, D., *Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: Possible implications in human implantation*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005. **73B**(1): p. 61-67.
106. Bellincampi, L. D., Closkey, R. F., Prasad, R., Zawadsky, J. P., and Dunn, M. G., *Viability of fibroblast-seeded ligament analogs after autogenous implantation*. Journal of Orthopaedic Research, 1998. **16**(4): p. 414-420.
107. Dunn, M. G., Tria, A. J., Kato, Y. P., Bechler, J. R., Ochner, R. S., Zawadsky, J. P., and Silver, F. H., *Anterior cruciate ligament reconstruction using a composite collagenous prosthesis: A biomechanical and histologic study in rabbits*. The American Journal of Sports Medicine, 1992. **20**(5): p. 507-515.
108. Ge, Z., Yang, F., Goh, J. C. H., Ramakrishna, S., and Lee, E. H., *Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **77A**(3): p. 639-652.

109. Kew, S. J., Gwynne, J. H., Enea, D., Abu-Rub, M., Pandit, A., Zeugolis, D., Brooks, R. A., Rushton, N., Best, S. M., and Cameron, R. E., *Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(9): p. 3237-3247.
110. Gentleman, E., Livesay, G., Dee, K., and Nauman, E., *Development of Ligament-Like Structural Organization and Properties in Cell-Seeded Collagen Scaffolds in vitro*. Annals of Biomedical Engineering, 2006. **34**(5): p. 726-736.
111. Khor, E., *Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses*. Biomaterials, 1997. **18**(2): p. 95-105.
112. Sung, H.-W., Huang, R.-N., Huang, L. L. H., and Tsai, C.-C., *In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1999. **10**(1): p. 63-78.
113. Gentleman, E., Lay, A. N., Dickerson, D. A., Nauman, E. A., Livesay, G. A., and Dee, K. C., *Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 2003. **24**(21): p. 3805-3813.
114. Koob, T. J. and Hernandez, D. J., *Material properties of polymerized NDGA-collagen composite fibers: development of biologically based tendon constructs*. Biomaterials, 2002. **23**(1): p. 203-212.
115. Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., and Spector, M., *The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis*. Biomaterials, 2001. **22**(23): p. 3145-3154.
116. Cholas, R. H., Hsu, H.-P., and Spector, M., *The reparative response to cross-linked collagen-based scaffolds in a rat spinal cord gap model*. Biomaterials, 2012. **33**(7): p. 2050-2059.
117. Ohan, M. P., Weadock, K. S., and Dunn, M. G., *Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **60**(3): p. 384-391.
118. Caruso, A. B. and Dunn, M. G., *Changes in mechanical properties and cellularity during long-term culture of collagen fiber ACL reconstruction scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. **73A**(4): p. 388-397.
119. Berry, C. C., Shelton, J. C., Bader, D. L., and Lee, D. A., *Influence of External Uniaxial Cyclic Strain on Oriented Fibroblast-Seeded Collagen Gels*. Tissue Engineering, 2003. **9**(4): p. 613-624.
120. Walters, V. I., Kwansa, A. L., and Freeman, J. W., *Design and Analysis of Braid-Twist Collagen Scaffolds*. Connective Tissue Research, 2012. **53**(3): p. 255-266.
121. Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., and Kaplan, D. L., *Silk-based biomaterials*. Biomaterials, 2003. **24**(3): p. 401-416.

122. Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S. C., and Wang, X., *Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. **65**(4): p. 457-470.
123. Wang, Y., Kim, H.-J., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D. L., *Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials*. *Biomaterials*, 2006. **27**(36): p. 6064-6082.
124. Santin, M., Motta, A., Freddi, G., and Cannas, M., *In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999. **46**(3): p. 382-389.
125. Jiang, P., Liu, H., Wang, C., Wu, L., Huang, J., and Guo, C., *Tensile behavior and morphology of differently degummed silkworm (*Bombyx mori*) cocoon silk fibres*. *Materials Letters*, 2006. **60**(7): p. 919-925.
126. Ho, M.-p., Wang, H., and Lau, K.-t., *Effect of degumming time on silkworm silk fibre for biodegradable polymer composites*. *Applied Surface Science*, 2012. **258**(8): p. 3948-3955.
127. Wang, H.-Y. and Zhang, Y.-Q., *Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization*. *Soft Matter*, 2013. **9**(1): p. 138-145.
128. Laurencin, C. L. and Freeman, J. W., *Ligament tissue engineering : an evolutionary materials science approach*. *Biomaterials*, 2005. **26**(36): p. 7530-7536.
129. Vaquette, C., Kahn, C., Frochot, C., Nouvel, C., Six, J.-L., Isla, N. D., Luo, L.-H., Cooper-White, J., Rahouadj, R., and Wang, X., *Aligned poly(L -lactic-co-ε-caprolactone) electrospun microfibers and knitted structure: A novel composite scaffold for ligament tissue engineering*. *Journal of Biomedical materials research A*, 2010. **94A**(4): p. 1270-1282.
130. Chen, X., Qi, Y.-Y., Wang, L.-L., Yin, Z., Yin, G.-L., Zou, X.-H., and Ouyang, H.-W., *Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix*. *Biomaterials*, 2008. **29**(27): p. 3683-3692.
131. Hairfield-Stein, M., England, C., Paek, H. J., Gilbraith, K. B., Dennis, R., Boland, E., and Kosnik, P., *Development of Self-Assembled, Tissue-Engineered Ligament from Bone Marrow Stromal Cells*. *Tissue Engineering*, 2007. **13**(4): p. 703-710.
132. Laurent, C., Durville, D., Mainard, D., Ganghoffer, J.-F., and Rahouadj, R., *A multilayer braided scaffold for Anterior Cruciate Ligament: Mechanical modeling at the fiber scale*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012. **12**(0): p. 184-196.
133. Farè, S., Torricelli, P., Giavaresi, G., Bertoldi, S., Alessandrino, A., Villa, T., Fini, M., Tanzi, M. C., and Freddi, G., *In vitro study on silk fibroin textile structure for Anterior Cruciate Ligament regeneration*. *Materials Science and Engineering: C*, (0).
134. Horan, R. L., Antle, K., Collette, A. L., Wang, Y., Huang, J., Moreau, J. E., Volloch, V., Kaplan, D. L., and Altman, G. H., *In vitro degradation of silk fibroin*. *Biomaterials*, 2005. **26**(17): p. 3385-3393.

135. Oliveira, A. L., Sun, L., Kim, H. J., Hu, X., Rice, W., Kluge, J., Reis, R. L., and Kaplan, D. L., *Aligned silk-based 3-D architectures for contact guidance in tissue engineering*. *Acta Biomaterialia*, 2012. **8**(4): p. 1530-1542.
136. Moreau, J. E., Bramono, D. S., Horan, R. L., Kaplan, D. L., and Altman, G. H., *Sequential Biochemical and Mechanical Stimulation in the Development of Tissue-Engineered Ligaments*. *Tissue Engineering Part A*, 2008. **14**(7): p. 1161-1172.
137. Moreau, J. E., Chen, J., Horan, R. L., Kaplan, D. L., and Altman, G. H., *Sequential Growth Factor Application in Bone Marrow Stromal Cell Ligament Engineering*. *Tissue Engineering*, 2005. **11**(11-12): p. 1887-1897.
138. Chen, J., Horan, R. L., Bramono, D., Moreau, J. E., Wang, Y., Geuss, L. R., Collette, A. L., Volloch, V., and Altman, G. H., *Monitoring Mesenchymal Stromal Cell Developmental Stage to Apply On-Time Mechanical Stimulation for Ligament Tissue Engineering*. *Tissue Engineering*, 2006. **12**(11): p. 3085-3095.
139. Fan, H., Liu, H., Toh, S. L., and Goh, J. C. H., *Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model*. *Biomaterials*, 2009. **30**(28): p. 4967-4977.
140. Fan, H., Liu, H., Toh, S. L., and Goh, J. C. H., *Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts on gelatin/silk fibroin hybrid scaffold*. *Biomaterials*, 2008. **29**(8): p. 1017-1027.
141. Fan, H., Liu, H., Wong, E. J. W., Toh, S. L., and Goh, J. C. H., *In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold*. *Biomaterials*, 2008. **29**(23): p. 3324-3337.
142. Liu, H., Fan, H., Toh, S. L., and Goh, J. C. H., *A comparison of rabbit mesenchymal stem cells and anterior cruciate ligament fibroblasts responses on combined silk scaffolds*. *Biomaterials*, 2008. **29**(10): p. 1443-1453.
143. Sahoo, S., Toh, S. L., and Goh, J. C. H., *A bFGF-releasing silk/PLGA-based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesenchymal progenitor cells*. *Biomaterials*, 2010. **31**(11): p. 2990-2998.
144. Shao, H.-J., Lee, Y.-T., Chen, C.-S., Wang, J.-H., and Young, T.-H., *Modulation of gene expression and collagen production of anterior cruciate ligament cells through cell shape changes on polycaprolactone/chitosan blends*. *Biomaterials*, 2010. **31**(17): p. 4695-4705.
145. Shao, H.-J., Chen, C. S., Lee, Y.-T., Wang, J.-H., and Young, T.-H., *The phenotypic responses of human anterior cruciate ligament cells cultured on poly(ϵ -caprolactone) and chitosan*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010. **93A**(4): p. 1297-1305.
146. Mathew, A. P., Oksman, K., Pierron, D. e., and Harmand, M.-F. o., *Fibrous cellulose nanocomposite scaffolds prepared by partial dissolution for potential use as ligament or tendon substitutes*. *Carbohydrate Polymers*, 2012. **87**(3): p. 2291-2298.

147. Funakoshi, T., Majima, T., Iwasaki, N., Yamane, S., Masuko, T., Minami, A., Harada, K., Tamura, H., Tokura, S., and Nishimura, S.-I., *Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. **74A**(3): p. 338-346.
148. Majima, T., Funakoshi, T., Iwasaki, N., Yamane, S.-T., Harada, K., Nonaka, S., Minami, A., and Nishimura, S.-I., *Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering*. Journal of Orthopaedic Science, 2005. **10**(3): p. 302-307.
149. Cristino, S., Grassi, F., Toneguzzi, S., Piacentini, A., Grigolo, B., Santi, S., Riccio, M., Tognana, E., Facchini, A., and Lisignoli, G., *Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11®-based prototype ligament scaffold*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. **73A**(3): p. 275-283.
150. Irie, T., Majima, T., Sawaguchi, N., Funakoshi, T., Nishimura, S.-i., and Minami, A., *Biomechanical and histologic evaluation of tissue engineered ligaments using chitosan and hyaluronan hybrid polymer fibers: A rabbit medial collateral ligament reconstruction model*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2011. **97A**(2): p. 111-117.
151. Leong, N. L., Petrigliano, F. A., and McAllister, D. R., *Current tissue engineering strategies in anterior cruciate ligament reconstruction*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013: p. n/a-n/a.
152. Lu, H. H., Cooper, J. A., Manuel, S., Freeman, J. W., Attawia, M. A., Ko, F. K., and Laurencin, C. T., *Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies*. Biomaterials, 2005. **26**(23): p. 4805-4816.
153. Freeman, J. W., Woods, M. D., and Laurencin, C. T., *Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design*. Journal of Biomechanics, 2007. **40**(9): p. 2029-2036.
154. Cooper, J. A., Bailey, L. O., Carter, J. N., Castiglioni, C. E., Kofron, M. D., Ko, F. K., and Laurencin, C. T., *Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament*. Biomaterials, 2006. **27**(13): p. 2747-2754.
155. Freeman, J. W., Woods, M. D., Cromer, D. A., Ekwueme, E. C., Andric, T., Atiemo, E. A., Bijoux, C. H., and Laurencin, C. T., *Evaluation of a hydrogel-fiber composite for ACL tissue engineering*. Journal of Biomechanics, 2011. **44**(4): p. 694-699.
156. Ouyang, H. W., Goh, J. C. H., Mo, X. M., Teoh, S. H., and Lee, E. H., *Characterization of anterior cruciate ligament cells and bone marrow stromal cells on various biodegradable polymeric films*. Materials Science and Engineering: C, 2002. **20**(1-2): p. 63-69.

157. Heckmann, L., Schlenker, H.-J., Fiedler, J., Brenner, R., Dauner, M., Bergenthal, G., Mattes, T., Claes, L., and Ignatius, A., *Human mesenchymal progenitor cell responses to a novel textured poly(L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2007. **81B**(1): p. 82-90.
158. Ladd, M. R., Lee, S. J., Stitzel, J. D., Atala, A., and Yoo, J. J., *Co-electrospun dual scaffolding system with potential for muscle-tendon junction tissue engineering*. Biomaterials, 2011. **32**(6): p. 1549-1559.
159. Barber, J. G., Handorf, A. M., Allee, T. J., and Li, W.-J., *Braided Nanofibrous Scaffold for Tendon and Ligament Tissue Engineering*. Tissue Engineering Part A, 2011.
160. Surrao, D. C., Waldman, S. D., and Amsden, B. G., *Biomimetic poly(lactide) based fibrous scaffolds for ligament tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(11): p. 3997-4006.
161. Surrao, D. C., Fan, J. C. Y., Waldman, S. D., and Amsden, B. G., *A crimp-like microarchitecture improves tissue production in fibrous ligament scaffolds in response to mechanical stimuli*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(10): p. 3704-3713.
162. Araque-Monrós, M. C., Vidaurre, A., Gil-Santos, L., Gironés Bernabé, S., Monleón-Pradas, M., and Más-Estellés, J., *Study of the degradation of a new PLA braided biomaterial in buffer phosphate saline, basic and acid media, intended for the regeneration of tendons and ligaments*. Polymer Degradation and Stability, 2013. **98**(9): p. 1563-1570.
163. Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., and Chua, C.-K., *The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors*. Tissue Engineering, 2001. **7**(6): p. 679-689.
164. Park, C. H., Rios, H. F., Jin, Q., Bland, M. E., Flanagan, C. L., Hollister, S. J., and Giannobile, W. V., *Biomimetic hybrid scaffolds for engineering human tooth-ligament interfaces*. Biomaterials, 2010. **31**(23): p. 5945-5952.
165. Lin, V. S., Lee, M. C., O'Neal, S., McKean, J., and Sung, K. L. P., *Ligament Tissue Engineering Using Synthetic Biodegradable Fiber Scaffolds*. Tissue Engineering, 1999. **5**(5): p. 443-451.
166. Vieira, A. C., Guedes, R. M., and Tita, V., *Constitutive models for biodegradable thermoplastic ropes for ligament repair*. Composite Structures, 2012. **94**(11): p. 3149-3159.
167. Lee, J., Choi, W. I., Tae, G., Kim, Y. H., Kang, S. S., Kim, S. E., Kim, S.-H., Jung, Y., and Kim, S. H., *Enhanced regeneration of the ligament–bone interface using a poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffold with local delivery of cells/BMP-2 using a heparin-based hydrogel*. Acta Biomaterialia, 2010. **7**(1): p. 244-257.

168. Cooper, J. A., Lu, H. H., Ko, F. K., Freeman, J. W., and Laurencin, C. T., *Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement : design considerations and in vitro evaluation*. *Biomaterials*, 2005. **26**(13): p. 1523-1532.
169. Van Eijk, F., Saris, D. B. F., Riesle, J., Willems, W. J., van Blitterswijk, C. A., Verbout, A. J., and Dhert, W. J. A., *Tissue Engineering of Ligaments: A Comparison of Bone Marrow Stromal Cells, Anterior Cruciate Ligament, and Skin Fibroblasts as Cell Source*. *Tissue Engineering*, 2004. **10**(5-6): p. 893-903.
170. Jenner, J. M. G. T., van Eijk, F., Saris, D. B. F., Willems, W. J., Dhert, W. J. A., and Creemers, L. B., *Effect of Transforming Growth Factor-Beta and Growth Differentiation Factor-5 on Proliferation and Matrix Production by Human Bone Marrow Stromal Cells Cultured on Braided Poly Lactic-Co-Glycolic Acid Scaffolds for Ligament Tissue Engineering*. *Tissue Engineering*, 2007. **13**(7): p. 1573-1582.
171. Chen, G., Sato, T., Sakane, M., Ohgushi, H., Ushida, T., Tanaka, J., and Tateishi, T., *Application of PLGA-collagen hybrid mesh for three-dimensional culture of canine anterior cruciate ligament cells*. *Materials Science and Engineering: C*, 2004. **24**(6-8): p. 861-866.
172. Sahoo, S., Ouyang, H., Goh, J. C. H., Tay, T. E., and Toh, S. L., *Characterization of a Novel Polymeric Scaffold for Potential Application in Tendon/Ligament Tissue Engineering*. *Tissue Engineering*, 2006. **12**(1): p. 91-99.
173. Buma, P., Kok, H. J., Blankevoort, L., Kuijpers, W., Huiskes, R., and Kampen, A., *Augmentation in anterior cruciate ligament reconstruction-a histological and biomechanical study on goats*. *International Orthopaedics*, 2004. **28**(2): p. 91-96.
174. Tovar, N., Bourke, S., Jaffe, M., Murthy, N. S., Kohn, J., Gatt, C., and Dunn, M. G., *A comparison of degradable synthetic polymer fibers for anterior cruciate ligament reconstruction*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009. **93A**(2): p. 738-747.
175. Bourke, S. L., Kohn, J., and Dunn, M. G., *Preliminary Development of a Novel Resorbable Synthetic Polymer Fiber Scaffold for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*. *Tissue Engineering*, 2004. **10**(1-2): p. 43-52.
176. Freeman, J. W., *Tissue engineered devices for ligament repair, replacement and regeneration*. *African Journal of Biotechnology*, 2009. **8**(25): p. 7182-7189.
177. Tamayol, A., Akbari, M., Annabi, N., Paul, A., Khademhosseini, A., and Juncker, D., *Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities*. *Biotechnology Advances*, 2013. **31**(5): p. 669-687.
178. Liu, H., Fan, H., Wang, Y., Toh, S. L., and Goh, J. C. H., *The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering*. *Biomaterials*, 2008. **29**(6): p. 662-674.

179. Konikoff, J. J., Billings, W., Nelson, L. J., and Hunter, J. M., *Development of a single stage active tendon prosthesis. I. Distal end attachment*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1974. **56**(4): p. 848.
180. Zeltinger, J., Sherwood, J. K., Graham, D. A., MÄ¼eller, R., and Griffith, L. G., *Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition*. Tissue Engineering, 2001. **7**(5): p. 557-572.
181. Freeman, J. W., Woods, M. D., Cromer, D. A., Wright, L. D., and Laurencin, C. T., *Tissue Engineering of the Anterior Cruciate Ligament: The Viscoelastic Behavior and Cell Viability of a Novel Braid-Twist Scaffold*. Journal of Biomaterials Science -- Polymer Edition, 2009. **20**(12): p. 1709-1728.
182. Nöth, U., Schupp, K., Heymer, A., Kall, S., Jakob, F., Schütze, N., Baumann, B., Barthel, T., Eulert, J., and Hendrich, C., *Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 447-455.
183. Wang, J. H. C., Yang, G., Li, Z., and Shen, W., *Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction*. Journal of Biomechanics, 2004. **37**(4): p. 573-576.
184. Cheng, M.-T., Yang, H.-W., Chen, T.-H., and Lee, O. K.-S., *Modulation of Proliferation and Differentiation of Human Anterior Cruciate Ligament-Derived Stem Cells by Different Growth Factors*. Tissue Engineering Part A, 2009. **15**(12): p. 3979-3989.
185. Steinert, A. F., Kunz, M., Prager, P., Barthel, T., Jakob, F., Nöth, U., Murray, M. M., Evans, C. H., and Porter, R. M., *Mesenchymal Stem Cell Characteristics of Human Anterior Cruciate Ligament Outgrowth Cells*. Tissue Engineering Part A, 2011. **17**(9-10): p. 1375-1388.
186. Petrigliano, F. A., MacAllister, D. R., and Wu, B. M., *Tissue engineering for anterior cruciate ligament reconstruction : a review of current strategies*. Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, 2006. **22**(4): p. 441-451.
187. Koh, C. J. and Atala, A., *Tissue Engineering, Stem Cells, and Cloning: Opportunities for Regenerative Medicine*. Journal of the American Society of Nephrology, 2004. **15**(5): p. 1113-1125.
188. Caplan, A. I. and Bruder, S. P., *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. Trends in Molecular Medicine, 2001. **7**(6): p. 259-264.
189. Bi, Y., Ehrichiou, D., Kilts, T. M., Inkson, C. A., Embree, M. C., Sonoyama, W., Li, L., Leet, A. I., Seo, B.-M., Zhang, L., Shi, S., and Young, M. F., *Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1219-1227.

190. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R., *Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143.
191. Van Eijk, F., Saris, D. B. F., Fedorovich, N. E., Kruyt, M. C., Willems, W. J., Verbout, A. J., Martens, A. C., Dhert, W. J. A., and Creemers, L., *In Vivo Matrix Production by Bone Marrow Stromal Cells Seeded on PLGA Scaffolds for Ligament Tissue Engineering*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **15**(10): p. 3109-3117.
192. Hankemeier, S., Keus, M., Zeichen, J., Jagodzinski, M., Barkhausen, T., Bosch, U., Krettek, C., and Griensven, M. V., *Modulation of Proliferation and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells by Fibroblast Growth Factor 2: Potential Implications for Tissue Engineering of Tendons and Ligaments*. *Tissue Engineering*, 2005. **11**(1-2): p. 41-49.
193. Bashur, C. A., Shaffer, R. D., Dahlgren, L. A., Guelcher, S. A., and Goldstein, A. S., *Effect of Fiber Diameter and Alignment of Electrospun Polyurethane Meshes on Mesenchymal Progenitor Cells*. *Tissue Engineering Part A*, 2009. **15**(9): p. 2435-2445.
194. Kanaya, A., Deie, M., Adachi, N., Nishimori, M., Yanada, S., and Ochi, M., *Intra-articular Injection of Mesenchymal Stromal Cells in Partially Torn Anterior Cruciate Ligaments in a Rat Model*. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 2007. **23**(6): p. 610-617.
195. Yates, E. W., Rupani, A., Foley, G. T., Khan, W. S., Cartmell, S., and Anand, S. J., *Ligament Tissue Engineering and Its Potential Role in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction*. *Stem Cells International*, 2012. **2012**.
196. Ball, S. G., Shuttleworth, A. C., and Kielty, C. M., *Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. **36**(4): p. 714-727.
197. Lee, I. C., Wang, J.-H., Lee, Y.-T., and Young, T.-H., *The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. **352**(1): p. 147-152.
198. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S., *Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-872.
199. Takahashi, K. and Yamanaka, S., *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-676.
200. Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S., *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2007. **448**(7151): p. 313-317.
201. Gurdon, J. B. and Melton, D. A., *Nuclear Reprogramming in Cells*. *Science*, 2008. **322**(5909): p. 1811-1815.

202. Fermor, B., Urban, J., Murray, D., Pocock, A., Lim, E., Francis, M., and Gage, J., *Proliferation and collagen synthesis of human anterior cruciate ligament cells in vitro: effects of ascorbate-2-phosphate, dexamethasone and oxygen tension*. Cell Biology International, 1998. **22**(9-10): p. 635-640.
203. Meaney Murray, M., Rice, K., Wright, R. J., and Spector, M., *The effect of selected growth factors on human anterior cruciate ligament cell interactions with a three-dimensional collagen-GAG scaffold*. Journal of Orthopaedic Research, 2003. **21**(2): p. 238-244.
204. Eberli, D., *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*. 2011: InTech.
205. Moreau, J. E., Chen, J., Bramono, D. S., Volloch, V., Chernoff, H., Vunjak-Novakovic, G., Richmond, J. C., Kaplan, D. L., and Altman, G. H., *Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells in vitro*. Journal of Orthopaedic Research, 2005. **23**(1): p. 164-174.
206. Chiquet-Ehrismann, R., Tannheimer, M., Koch, M., Brunner, A., Spring, J., Martin, D., Baumgartner, S., and Chiquet, M., *Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels*. The Journal of Cell Biology, 1994. **127**(6): p. 2093-2101.
207. Toyoda, T., Matsumoto, H., Fujikawa, K., Saito, S., and Inoue, K., *Tensile Load and the Metabolism of Anterior Cruciate Ligament Cells*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1998. **353**: p. 247-255.
208. Chiquet, M., Koch, M., Matthisson, M., Tannheimer, M., and Chiquet-Ehrismann, R., *Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress*. Biochemistry and Cell Biology, 1996. **74**(6): p. 737-744.
209. Altman, G. H., Horan, R. L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P. R. H., Volloch, V., Richmond, J. C., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D. L., *Cell differentiation by mechanical stress*. The FASEB Journal, 2001.
210. Jones, B. F., Wall, M. E., Carroll, R. L., Washburn, S., and Banes, A. J., *Ligament cells stretch-adapted on a microgrooved substrate increase intercellular communication in response to a mechanical stimulus*. Journal of Biomechanics, 2005. **38**(8): p. 1653-1664.
211. Raïf, E. M., Seedhom, B. B., Pullan, M. J., and Toyoda, T., *Cyclic Straining of Cell-Seeded Synthetic Ligament Scaffolds: Development of Apparatus and Methodology*. Tissue Engineering, 2007. **13**(3): p. 629-640.
212. Subramony, S. D., Dargis, B. R., Castillo, M., Azeloglu, E. U., Tracey, M. S., Su, A., and Lu, H. H., *The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation*. Biomaterials, 2013. **34**(8): p. 1942-1953.

213. Doroski, D. M., Levenston, M. E., and Temenoff, J. S., *Cyclic Tensile Culture Promotes Fibroblastic Differentiation of Marrow Stromal Cells Encapsulated in Poly(Ethylene Glycol)-Based Hydrogels*. *Tissue Engineering Part A*, 2010. **16**(11): p. 3457-3466.
214. Ducheyne, P., Healy, K. E., Hutmacher, D. E., and Kirkpatrick, C. J., *Comprehensive Biomaterials*. 2011: Elsevier Science & Technology.
215. Emeka, O., Madhusudhan, N., and Wasim, S. K., *The Role of Bioreactors in Tissue Engineering for Musculoskeletal Applications*. *The Open Orthopaedics Journal*, 2011. **5**(Suppl2-M6): p. 267-270.
216. Zhang, L., Kahn, C. J. F., Chen, H.-Q., Tran, N., and Wang, X., *Effect of uniaxial stretching on rat bone mesenchymal stem cell: Orientation and expressions of collagen types I and III and tenascin-C*. *Cell Biology International*, 2008. **32**(3): p. 344-352.
217. Martin, Y. and Vermette, P., *Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances*. *Biomaterials*, 2005. **26**(35): p. 7481-7503.
218. Wang, T., Gardiner, B. S., Lin, Z., Rubenson, J., Kirk, T. B., Wang, A., Xu, J., Smith, D. W., Lloyd, D. G., and Zheng, M. H., *Bioreactor Design for Tendon/Ligament Engineering*. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2013. **19**(2): p. 133-146.
219. Chen, Q., Liang, S., and Thouas, G. A., *Elastomeric biomaterials for tissue engineering*. *Progress in Polymer Science*, 2013. **38**(3-4): p. 584-671.
220. Spontak, R. J. and Patel, N. P., *Thermoplastic elastomers: fundamentals and applications*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2000. **5**(5-6): p. 333-340.
221. Lipik, V. T., Kong, J. F., Chattopadhyay, S., Widjaja, L. K., Liow, S. S., Venkatraman, S. S., and Abadie, M. J. M., *Thermoplastic biodegradable elastomers based on ϵ -caprolactone and L-lactide block co-polymers : a new synthetic approach*. *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**(11): p. 4261-4270.
222. Fernández, J., Etxeberria, A., Ugartemendia, J. M., Petisco, S., and Sarasua, J.-R., *Effects of chain microstructures on mechanical behavior and aging of a poly(L-lactide-co--caprolactone) biomedical thermoplastic-elastomer*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012. **12**(0): p. 29-38.
223. Avella, M., Martuscelli, E., and Raimo, M., *Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers*. *Journal of Materials Science*, 2000. **35**(3): p. 523-545.
224. Giavaresi, G., Tschon, M., Borsari, V., Daly, J. H., Liggat, J. J., Fini, M., Bonazzi, V., Nicolini, A., Carpi, A., Morra, M., Cassinelli, C., and Giardino, R., *New polymers for drug delivery systems in orthopaedics: in vivo biocompatibility evaluation*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004. **58**(8): p. 411-417.

225. Luo, S., Grubb, D. T., and Netravali, A. N., *The effect of molecular weight on the lamellar structure, thermal and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerates)*. *Polymer*, 2002. **43**(15): p. 4159-4166.
226. Król, P., *Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers*. *Progress in Materials Science*, 2007. **52**(6): p. 915-1015.
227. Santerre, J. P., Woodhouse, K., Laroche, G., and Labow, R. S., *Understanding the biodegradation of polyurethanes : from classical implants to tissue engineering materials*. *Biomaterials*, 2005. **26**(35): p. 7457-7470.
228. Liu, Q., Jiang, L., Shi, R., and Zhang, L., *Synthesis, preparation, in vitro degradation, and application of novel degradable bioelastomers-A review*. *Progress in Polymer Science*, 2012. **37**(5): p. 715-765.
229. Cohn, D. and Hotovely-Salomon, A., *Biodegradable multiblock PEO/PLA thermoplastic elastomers : molecular design and properties*. *Polymer*, 2005. **46**(7): p. 2068-2075.
230. Cohn, D., Stern, T., and González, M. F., *Biodegradable poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers*. *Journal of Biomedical materials research A*, 2001. **59**(2): p. 273-281.
231. Cohn, D. and Hotovely-Salomon, A., *Designing biodegradable multiblock PCL/PLA thermoplastic elastomers*. *Biomaterials*, 2005. **26**(15): p. 2297-2305.
232. Zhang, C., Wen, X., Vyavahare, N. R., and Boland, T., *Synthesis and characterization of biodegradable elastomeric polyurethane scaffolds fabricated by the inkjet technique*. *Biomaterials*, 2008. **29**(28): p. 3781-3791.
233. Wang, W., Guo, Y., and Otaigbe, J. U., *Synthesis, characterization and degradation of biodegradable thermoplastic elastomers from poly(ester urethane)s and renewable soy protein isolate biopolymer*. *Polymer*, 2010. **51**(23): p. 5448-5455.
234. Hashizume, R., Fujimoto, K. L., Hong, Y., Amoroso, N. J., Tobita, K., Miki, T., Keller, B. B., Sacks, M. S., and Wagner, W. R., *Morphological and mechanical characteristics of the reconstructed rat abdominal wall following use of a wet electrospun biodegradable polyurethane elastomer scaffold*. *Biomaterials*, 2010. **31**(12): p. 3253-3265.
235. Sobczak, M., Debek, C., and Gos, P., *Preparation and mechanical properties of PCL-based polyurethanes as potential biomaterials for short-term applications*. *e-Polymers*, 2010. **148**.
236. Gorna, K. and Gogolewski, S., *In vitro degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on ϵ -caprolactone and Pluronic® with various hydrophilicities*. *Polymer Degradation and Stability*, 2002. **75**(1): p. 113-122.

237. Zhang, J., Xu, J., Wang, H., Jin, W., and Li, J., *Synthesis of multiblock thermoplastic elastomers based on biodegradable poly (lactic acid) and polycaprolactone*. *Materials Science and Engineering: C*, 2009. **29**(3): p. 889-893.
238. Pinchuk, L., *A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of 'biostable' polyurethanes*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1995. **6**(3): p. 225-267.
239. Gunatillake, P. A., Martin, D. J., Meijs, G. F., McCarthy, S. J., and Adhikari, R., *Designing Biostable Polyurethane Elastomers for Biomedical Implants*. *Australian Journal of Chemistry*, 2003. **56**(6): p. 545-557.
240. Dey, J., Xu, H., Shen, J., Thevenot, P., Gondi, S. R., Nguyen, K. T., Sumerlin, B. S., Tang, L., and Yang, J., *Development of biodegradable crosslinked urethane-doped polyester elastomers*. *Biomaterials*, 2008. **29**(35): p. 4637-4649.
241. Liu, Q., Wu, J., Tan, T., Zhang, L., Chen, D., and Tian, W., *Preparation, properties and cytotoxicity evaluation of a biodegradable polyester elastomer composite*. *Polymer Degradation and Stability*, 2009. **94**(9): p. 1427-1435.
242. Pomerantseva, I., Krebs, N., Hart, A., Neville, C. M., Huang, A. Y., and Sundback, C. A., *Degradation behavior of poly(glycerol sebacate)*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009. **91A**(4): p. 1038-1047.
243. Bruggeman, J. P., de Bruin, B.-J., Bettinger, C. J., and Langer, R., *Biodegradable poly(polyol sebacate) polymers*. *Biomaterials*, 2008. **29**(36): p. 4726-4735.
244. Yang, J., Webb, A. R., and Ameer, G. A., *Novel Citric Acid-Based Biodegradable Elastomers for Tissue Engineering*. *Advanced Materials*, 2004. **16**(6): p. 511-516.
245. Yang, J., Webb, A. R., Pickerill, S. J., Hageman, G., and Ameer, G. A., *Synthesis and evaluation of poly(diols citrate) biodegradable elastomers*. *Biomaterials*, 2006. **27**(9): p. 1889-1898.
246. Serrano, M. C., Chung, E. J., and Ameer, G. A., *Advances and applications of biodegradable elastomers in regenerative medicine*. *Advanced Functional Materials*, 2010. **20**(2): p. 192-208.
247. Ilagan, B. G. and Amsden, B. G., *Surface modifications of photocrosslinked biodegradable elastomers and their influence on smooth muscle cell adhesion and proliferation*. *Acta Biomaterialia*, 2009. **5**(7): p. 2429-2440.
248. Sabater i Serra, R., Escobar Ivirico, J. L., Meseguer Dueñas, J. M., Balado, A. A., Gómez Ribelles, J. L., and Salmerón Sánchez, M., *Segmental dynamics in poly(ϵ -caprolactone)/poly(L-lactide) copolymer networks*. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2009. **47**(2): p. 183-193.
249. Gu, F., Younes, H. M., El-Kadi, A. O. S., Neufeld, R. J., and Amsden, B. G., *Sustained interferon- β delivery from a photocrosslinked biodegradable elastomer*. *Journal of Controlled Release*, 2005. **102**(3): p. 607-617.

250. Kade, M. J., Burke, D. J., and Hawker, C. J., *The power of thiol-ene chemistry*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2009. **48**(4): p. 743-750.
251. Bat, E., Kothman, B. H. M., Higuera, G. A., van Blitterswijk, C. A., Feijen, J., and Grijpma, D. W., *Ultraviolet light crosslinking of poly(trimethylene carbonate) for elastomeric tissue engineering scaffolds*. Biomaterials, 2010. **31**(33): p. 8696-8705.
252. Wischke, C., Tripodo, G., Choi, N.-Y., and Lendlein, A., *Hydrolytic Degradation Behavior of Poly(rac-lactide)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(rac-lactide) Dimethacrylate Derived Networks Designed for Biomedical Applications*. Macromolecular Bioscience, 2011. **11**(12): p. 1637-1646.
253. Harrane, A., Leroy, A., Nouailhas, H., Garric, X., Coudane, J., and Nottelet, B., *PLA-based biodegradable and tunable soft elastomers for biomedical applications*. Biomedical Materials, 2011. **6**(6): p. 065006.
254. Yang, S.-I., Wu, Z.-H., Yang, W., and Yang, M.-B., *Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA)*. Polymer Testing, 2008. **27**(8): p. 957-963.
255. Jin, F., Hyon, S.-H., Iwata, H., and Tsutsumi, S., *Crosslinking of Poly(L-lactide) by γ -Irradiation*. Macromolecular Rapid Communications, 2002. **23**(15): p. 909-912.
256. Quynh, T. M., Mitomo, H., Zhao, L., and Asai, S., *The radiation crosslinked films based on PLLA/PDLA stereocomplex after TAIC absorption in supercritical carbon dioxide*. Carbohydrate Polymers, 2008. **72**(4): p. 673-681.
257. Quynh, T. M., Mitomo, H., Nagasawa, N., Wada, Y., Yoshii, F., and Tamada, M., *Properties of crosslinked polylactides (PLLA & PDLA) by radiation and its biodegradability*. European Polymer Journal, 2007. **43**(5): p. 1779-1785.
258. Huang, M.-H., Li, S., and Vert, M., *Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of ϵ -caprolactone and dl-lactide*. Polymer, 2004. **45**(26): p. 8675-8681.
259. Kowalski, A., Duda, A., and Penczek, S., *Polymerization of l,l-Lactide Initiated by Aluminum Isopropoxide Trimer or Tetramer*. Macromolecules, 1998. **31**(7): p. 2114-2122.
260. Li, S. M., Rashkov, I., Espartero, J. L., Manolova, N., and Vert, M., *Synthesis, Characterization, and Hydrolytic Degradation of PLA/PEO/PLA Triblock Copolymers with Long Poly(l-lactic acid) Blocks*. Macromolecules, 1996. **29**(1): p. 57-62.
261. Hakkarainen, M., Albertsson, A.-C., and Karlsson, S., *Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo- and copolymers of PLA and PGA*. Polymer Degradation and Stability, 1996. **52**(3): p. 283-291.

262. Stefani, M., Coudane, J., and Vert, M., *In vitro ageing and degradation of PEG-PLA diblock copolymer-based nanoparticles*. *Polymer Degradation and Stability*, 2006. **91**(11): p. 2554-2559.
263. Stefani, M., Coudane, J., and Vert, M., *Effects of polymerization conditions on the in vitro hydrolytic degradation of plaques of poly(dl-lactic acid-block-ethylene glycol) diblock copolymers*. *Polymer Degradation and Stability*, 2006. **91**(12): p. 2853-2859.
264. Li, S. M., Garreau, H., and Vert, M., *Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1990. **1**(3): p. 131-139.
265. Venkatraman, S. S., Jie, P., Min, F., Freddy, B. Y. C., and Leong-Huat, G., *Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005. **298**(1): p. 219-232.
266. Santonja-Blasco, L., Moriana, R., Badía, J. D., and Ribes-Greus, A., *Thermal analysis applied to the characterization of degradation in soil of polylactide: I. Calorimetric and viscoelastic analyses*. *Polymer Degradation and Stability*, 2010. **95**(11): p. 2185-2191.
267. Vert, M., Li, S., and Garreau, H., *More about the degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media*. *Journal of Controlled Release*, 1991. **16**(1-2): p. 15-26.
268. Pourcelle, V., Freichels, H., Stoffelbach, F., Auzély-Velty, R., Jérôme, C., and Marchand-Brynaert, J., *Light Induced Functionalization of PCL-PEG Block Copolymers for the Covalent Immobilization of Biomolecules*. *Biomacromolecules*, 2009. **10**(4): p. 966-974.
269. Borden, W. T., Gritsan, N. P., Hadad, C. M., Karney, W. L., Kemnitz, C. R., and Platz, M. S., *The Interplay of Theory and Experiment in the Study of Phenylnitrene*. *Accounts of Chemical Research*, 2000. **33**(11): p. 765-771.
270. Schuster, G. B. and Platz, M. S., *Photochemistry of Phenyl Azide*, in *Advances in Photochemistry*. 2007, John Wiley & Sons, Inc. p. 69-143.
271. Rupp, B., Ebner, C., Rossegger, E., Slugovc, C., Stelzer, F., and Wiesbrock, F., *UV-induced crosslinking of the biopolyester poly(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)*. *Green Chemistry*, 2010. **12**(10): p. 1796-1802.
272. Boufarguine, M., Guinault, A., Miquelard-Garnier, G., and Sollogoub, C., *PLA/PHBV Films with Improved Mechanical and Gas Barrier Properties*. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2012. **298**(10): p. 1065-1073.
273. Ponsart, S., Coudane, J., and Vert, M., *A Novel Route To Poly(ϵ -caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization*. *Biomacromolecules*, 2000. **1**(2): p. 275-281.
274. Nottelet, B., Coudane, J., and Vert, M., *Synthesis of an X-ray opaque biodegradable copolyester by chemical modification of poly($\dot{\mu}$ -caprolactone)*. *Biomaterials*, 2006. **27**(28): p. 4948-4954.

275. El Habnoui, S., Lavigne, J.-P., Darcos, V., Porsio, B., Garric, X., Coudane, J., and Nottelet, B., *Toward potent antibiofilm degradable medical devices: A generic method for the antibacterial surface modification of polylactide*. *Acta Biomaterialia*, 2013. **9**(8): p. 7709-7718.
276. Nottelet, B., *Synthèse et caractérisation de nouveaux polyesters dégradables et hydrosolubles cationiques ou amphotères*. 2005, Université Montpellier 2: Montpellier. p. 184.
277. Lowe, A. B., Hoyle, C. E., and Bowman, C. N., *Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis*. *Journal of Materials Chemistry*, 2010. **20**(23): p. 4745-4750.
278. Williams, C. G., Malik, A. N., Kim, T. K., Manson, P. N., and Elisseeff, J. H., *Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation*. *Biomaterials*, 2005. **26**(11): p. 1211-1218.
279. Coimbra, P., Fernandes, D., Ferreira, P., Gil, M. H., and de Sousa, H. C., *Solubility of Irgacure® 2959 photoinitiator in supercritical carbon dioxide: Experimental determination and correlation*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008. **45**(3): p. 272-281.
280. Jung, H. H., Park, K., and Han, D. K., *Preparation of TGF- β 1-conjugated biodegradable pluronic F127 hydrogel and its application with adipose-derived stem cells*. *Journal of Controlled Release*, 2010. **147**(1): p. 84-91.
281. Rey-Rico, A., Silva, M., Couceiro, J., Concheiro, A., and Alvarez-Lorenzo, C., *Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2*. *Eur Cell Mater*, 2011. **21**: p. 317-40.
282. Paxton, J. Z., Grover, L. M., and Baar, K., *Engineering an In Vitro Model of a Functional Ligament from Bone to Bone*. *Tissue Engineering Part A*, 2010. **16**(11): p. 3515-3525.
283. Lee, J. Y., Zhou, Z., Taub, P. J., Ramcharan, M., Li, Y., Akinbiyi, T., Maharam, E. R., Leong, D. J., Laudier, D. M., Ruike, T., Torina, P. J., Zaidi, M., Majeska, R. J., Schaffler, M. B., Flatow, E. L., and Sun, H. B., *BMP-12 Treatment of Adult Mesenchymal Stem Cells In Vitro Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo*. *PLoS ONE*, 2011. **6**(3): p. e17531.
284. Hoffmann, A., Pelled, G., Turgeman, G., Eberle, P., Zilberman, Y., Shinar, H., Keinan-Adamsky, K., Winkel, A., Shahab, S., Navon, G., Gross, G., and Gazit, D., *Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006. **116**(4): p. 940-952.
285. Lou, J., Tu, Y., Burns, M., Silva, M. J., and Manske, P., *BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001. **19**(6): p. 1199-1202.

286. Gregory, C. A., Ylostalo, J., and Prockop, D. J., *Adult Bone Marrow Stem/Progenitor Cells (MSCs) Are Preconditioned by Microenvironmental "Niches" in Culture: A Two-Stage Hypothesis for Regulation of MSC Fate*. Sci. STKE, 2005. **2005**(294): p. pe37-.
287. Neuhuber, B., Swanger, S. A., Howard, L., Mackay, A., and Fischer, I., *Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics*. Experimental Hematology, 2008. **36**(9): p. 1176-1185.
288. Ma, J., Smietana, M. J., Kostrominova, T. Y., Wojtys, E. M., Larkin, L. M., and Arruda, E. M., *Three-Dimensional Engineered Bone-Ligament-Bone Constructs for Anterior Cruciate Ligament Replacement*. Tissue Engineering Part A, 2011.

Ingénierie tissulaire du ligament

Association de copolymères dégradables et de cellules souches mésenchymateuses

Résumé : L'ingénierie tissulaire est une discipline récente aux enjeux ambitieux et prometteurs : la régénération de tissus ou d'organes lésés voire détruits en mettant à profit des connaissances et compétences dans différents domaines à l'interface de la chimie et de la biologie. Pour répondre à la demande d'alternatives aux techniques chirurgicales actuelles de réparation du ligament antérieur croisé, nous avons décidé d'appliquer l'ingénierie tissulaire à ce tissu en associant matrices en polymères dégradables et cellules souches mésenchymateuses (CSM). Dans un premier temps, nous avons donc travaillé à la synthèse de polymères adaptés à l'application en cherchant à mettre l'accent sur l'obtention de propriétés élastiques. De nouveaux élastomères dégradables obtenus par des approches originales de photoréticulation chimique de polylactide (PLA) et de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) par voie nitrène ou thiol-yne ont notamment été développés avec des résultats prometteurs. En parallèle, des copolymères thermoplastiques multiblocs à base de PLA et poloxamine ou poloxamère nous ont permis de mener une étude plus appliquée. Ces copolymères ont en effet montré, en particulier au cours d'une étude de dégradation *in vitro* de 7 semaines, des propriétés, notamment thermiques et mécaniques, qui font d'eux des candidats intéressants pour la conception d'une matrice ligamentaire. C'est pourquoi ils ont été utilisés pour la conception de prototypes de matrices de régénération textiles dont les propriétés mécaniques se sont révélées être très proches de celles du ligament. Après avoir démontré l'excellente cytocompatibilité de ces matrices avec des CSM, nous avons finalement mené des expériences de différenciation *in vitro* de ces CSM et sommes parvenus à favoriser leur orientation vers un phénotype ligamentocytaire, notamment grâce à un procédé de stimulation mécanique cyclique des cellules ensemencées sur les matrices textiles.

Mots-clés : biomatériaux, ingénierie tissulaire, biopolymères dégradables, cellules souches mésenchymateuses, ligament croisé antérieur

Ligament tissue engineering

Association of degradable copolymers and mesenchymal stem cells

Abstract: Tissue engineering is a recent discipline with ambitious and promising stakes: the regeneration of wounded or destroyed tissues or organs by taking advantage of knowledge and skills in various fields at the interface of chemistry and biology. In order to meet the need for alternatives to current surgical techniques of anterior cruciate ligament repair, we decided to apply the tissue engineering approach to this tissue by associating degradable polymer scaffolds and mesenchymal stem cells (MSCs). At first we worked on the synthesis of biodegradable polymers suitable for the application and focused on getting elastic properties. New degradable elastomers obtained by chemical photocrosslinking of polylactide (PLA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) were developed by following nitrene or thiol-yne strategies and yielded promising results. In parallel, a more in depth and practical study was performed with PLA based thermoplastic multiblock copolymers embedding poloxamer or poloxamine. These copolymers exhibited properties that make them attractive candidates for the design of ligament regeneration scaffolds, and especially their thermal and mechanical properties during a 7 week *in vitro* degradation test. That is why they were used to design prototypes of textile scaffolds whose mechanical properties were found to be very close to the ligament's ones. After demonstrating the excellent cytocompatibility of these scaffolds with MSCs, we finally carried out *in vitro* differentiation experiments on these MSCs and managed to induce their orientation towards a ligamentocyte phenotype, particularly through a process of cyclic mechanical stimulation of cells seeded on the textile scaffolds.

Keywords: biomaterials, tissue engineering, degradable biopolymers, mesenchymal stem cells, anterior cruciate ligament