

Université de PAU et des Pays de l'Adour

UFR Sciences et Techniques

THESE

Pour obtenir le grade de:

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Discipline: Chimie

Spécialité: Polymères

par

**Cristina-Mihaela IGNAT (épouse LEFTER)**

**Compatibilité et co-structuration dans des systèmes contenant des  
scléroprotéines et des polysaccharides**

Soutenue le 26 Septembre 2012 à Université Technique "Gh. Asachi", Iasi, Roumanie

devant la commission d'examen:

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| M. Teodor MALUȚAN        | Président du jury    |
| M. Marcel POPA           | (directeur de thèse) |
| M. Jacques DESBRIERES    | (directeur de thèse) |
| M. Laurent LEBRUN        | Membre               |
| M. Jean-François CHAILAN | Membre               |
| M. Valeriu SUNEL         | Membre               |
| M. Stelian Sergiu MAIER  | Invité               |

Département des Polymères Naturels et Synthétiques, Université Technique "Gh. Asachi", D. Mangeron,  
no. 71A, 700050, Iasi, Roumanie

Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, IPREM, UMR 5254  
CNRS/UPPA, Hélioparc, 2 avenue du Président Angot, 64053 Pau cedex 9, France



# **Introduction**

## **Étude bibliographique**

### **Chapitre I. Applications biomédicales des systèmes collagène - polysaccharides**

#### I.1 Composante collagénique

##### I.1.1 Niveaux d'organisations moléculaires des collagènes fibrillaires

###### I.1.1.1 Structure primaire

###### I.1.1.2 Structure secondaire

###### I.1.1.3 Structure tertiaire

###### I.1.1.4 Structure quaternaire

##### I.1.2 Biosynthèse du collagène

##### I.1.3 Classification des formes collagéniques

##### I.1.4 Propriétés physico-chimiques des formes collagéniques

###### I.1.4.1 Propriétés mécaniques du collagène

###### I.1.4.2 Propriétés thermiques du collagène

###### I.1.4.3 Biodégradation des collagènes

##### I.1.5 Applications du collagène

#### I.2 Composant polysaccharidique

##### I.2.1 Polysaccharides communs

###### I.2.1.1 Chitine et chitosane

###### I.2.1.2 Acide hyaluronique

###### I.2.1.3 Gomme gellane

#### I.3 Modalités d'association des protéines (du collagène) avec les polysaccharides

#### I.4 Applications des systèmes protéines – polysaccharides

### **Chapitre II. Obtention des hydrogels à base de collagène et des polysaccharides**

#### II.1 Introduction

#### II.2 Classification des hydrogels

#### II.3 Méthodes d'obtention des hydrogels

##### II.3.1 Obtention des hydrogels par réticulation chimique

##### II.3.2 Obtention des hydrogels par réticulation physique

#### II.4 Propriétés des hydrogels

##### II.4.1 La capacité d'absorption/incorporation de fluides

##### II.4.2. Biodégradabilité des hydrogels

##### II.4.3. Cytotoxicité

##### II.4.4. Perméabilité

II.4.5. Adaptabilité aux procédures de stérilisation

II.5 Applications biomédicales des hydrogels

II.5.1. Applications ophtalmologiques

II.5.2. Systèmes à libération contrôlée de médicaments

II.5.3. Pansements pour les plaies

II.5.4. Hydrogels pour l'ingénierie tissulaire

II.5.5. Applications des hydrogels dans l'industrie alimentaire

II.5.6. Applications des hydrogels en agriculture

## **Résultats originaux**

### **Chapitre III. Matériaux et méthodes expérimentales**

III.1 Extraction et Purification de l'atelocollagène

III.2. Obtention de la solution standard d'atelocollagène, d'hyaluronate de sodium et de gellane

III.3. Caractérisation du sol d'atelocollagène

III.4 Obtention d'hydrogels à base de collagène et de collagène-polysaccharide

III.5 Méthodes de caractérisation des hydrogels et cryogels

### **Chapitre IV. Obtention des mélanges reproductibles d'atelocollagène et de polysaccharides**

IV.1. Investigation par turbidimétrie des solutions colloïdales des biopolymères naturels

IV.2. Étude rhéologique des solutions diluées de biopolymères naturels

IV.3. Diagrammes de phase binaires entre l'atelocollagène et l'hyaluronate ou le gellane

IV.4. Diagrammes ternaires des mélanges d'atelocollagène, hyaluronate de sodium et gellane

### **Chapitre V. Hydrogels réticulés de manière covalente avec une composante de collagène et collagène – polysaccharides**

V.1. Estimation de la reproductibilité des hydrogels réticulés avec une composante de collagène par caractérisation rhéologique

V.2. Étude par rhéologie des hydrogels à base de collagène et collagène – polysaccharides

V.3. Analyse thermique

V.4. Caractérisation morphologique par microscopie électronique à balayage

V.5. Degré maximal de gonflement

V.6. Capacité d'inclusion des hydrogels avec la Levofloxacin

V.7. Etude de biocompatibilité des hydrogels

V.7.1 Caractérisation de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire des hydrogels

V.7.2 Études de la prolifération cellulaire des hydrogels

V.7.3 Visualisation des cellules viables par microscopie confocale à balayage

## **Conclusions générales**

## **Références**



## Introduction

L'obtention de substrats „cyto-favorables”, aptes à soutenir la régénération tissulaire, impose l'utilisation de biomatériaux qui portent des domaines de reconnaissance cellulaire, comme par exemple les scléroprotéines et certains polysaccharides. La membrane des cellules spécifiques aux tissus conjonctifs dispose de mécanismes qui facilitent l'ancrage aux substrats solides ou à l'état de gel où se retrouvent des macromolécules ou des fibrilles de (atelo) collagène, associées ou non à l'acide hyaluronique. On peut générer de tels substrats par des techniques de rassemblement moléculaire spontané ordonné (tout comme dans le cas de la restructuration du collagène quasi-natif pour former des fibrilles), ou induite physico-chimiquement ensuite stabilisé morphologiquement (tout comme dans le cas de la préparation des hydrogels mixtes, atelocollagène – hyaluronate de sodium, diversement réticulés ensuite transformés en cryo- ou vitri-gels). Dans le cas de la deuxième manière de rassemblement on obtient des systèmes pseudo-fibrillaires à structure irrégulière, le plus souvent chaotique. La morphologie des différents systèmes diffère significativement de celles des tissus natifs, mais leur réactivité physico-chimique d'ensemble peut être portée à des valeurs suffisamment proches de celles des tissus qu'on veut remplacer. L'inclusion, dans des rapports molaires aussi réduits que possible, des espèces chimiques non naturelles est essentielle dans le réglage de la réactivité des substrats destinés à la culture cellulaire comme agent ou adjuvant de la restructuration. Ainsi, on assure d'une part une exposition maximale des domaines de reconnaissance cellulaire propres aux biomacromolécules, et d'autre part, une restructuration proche de la morphologie native, ce qui permet d'atteindre une valeur optimale de la densité volumique des domaines de reconnaissance (exprimée en femto-moles par micron cube).

Dans le cadre de la thèse, nous étudions les moyens d'obtention et de purification des précurseurs bio-macromoléculaires nécessaires, par la suite, à l'obtention de substrats „cyto-favorables”, ainsi que leurs modalités de génération et de caractérisation. Les méthodes de restructuration auxquelles on en appelle sont de nature physico-chimique (la coprécipitation contrôlée dans des mélanges binaires et ternaires d'atelocollagène et d'hyaluronate de sodium), ou chimique (la réticulation par des ponts moléculaires à longueur minimale).

Tout en suivant les principes qui viennent d'être énoncés, nous visons l'obtention et la caractérisation physico-chimique de certains substrats solides et réhydratables sous contrôle, avec un niveau au dessus de la moyenne des substrats usuels, où les biomacromolécules participent à la formation de réseaux semi-interpénétrés, ou sont associées physico-chimiquement (co-précipitation) ou réticulées chimiquement en utilisant des composés macromoléculaires de synthèse. Les espèces chimiques impliquées et les processus de

réticulation auxquels elles participent sont sélectionnés de sorte que les rendements des réactions soient aussi élevés que possible, mais que les quantités de résidus soient minimales, les produits respectifs étant peu réactifs et faciles à neutraliser ou à éliminer.

**Les thématiques de la thèse sont dans les domaines scientifiques suivants:**

- la chimie des composés macromoléculaires d'origine naturelle;
- la physico-chimie des systèmes biopolymères;
- l'ingénierie tissulaire.

**Les objectifs de la thèse sont:**

- L'étude des modalités d'extraction et de purification des formes collagéniques dénaturées de manière minimale et à réactivité contrôlée.
- L'étude de la compatibilité et de la stabilité dans les mélanges d'atelocollagène et de polysaccharides.
- L'étude des effets du mélange et de la coprécipitation dans des systèmes atelocollagène - polysaccharides.
- L'étude de la cytocompatibilité des substrats obtenus à partir des mélanges atelocollagène – polysaccharides.

**Plan de déroulement des expériences dans le cadre de la thèse**

| Objectifs   | Activités prévues   |
|---|---|
| L'extraction et la purification des formes collagéniques dénaturées de manière minimale | <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'isolement et la transformation préliminaire des sources tissulaires de collagène.</li> <li>- La solubilisation sous assistance enzymatique du collagène fibrillaire de type I.</li> <li>- L'obtention de solutions colloïdales d'atelocollagène</li> <li>- L'introduction de l'hypoimmunogénicité de l'atelocollagène solubilisé;</li> <li>- L'élimination des fractions d'atelocollagène dénaturées.</li> <li>- La purification des solutions colloïdales d'atelocollagène hypoimmunogène.</li> </ul> |

|  |   |
|--|---|
|  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- La caractérisation physico-chimique, rhéologique et microstructurale des formes atelocollagéniques obtenues.</li> </ul>  |
| <p>L'étude de la compatibilité et de la stabilité dans les mélanges d'atelocollagène et de polysaccharides</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'étude préliminaire des paramètres physico-chimiques du mélange de solutions d'atelocollagène et de polysaccharides</li> <li>- La formulation des mélanges et des mélanges qui contiennent de l'atelocollagène et des polysaccharides</li> <li>- La réalisation et la caractérisation des mélanges d'atelocollagène et de hyaluronate de sodium, par réticulation avec des composés di-oxiraniques à molécules à chaîne courte.</li> <li>- L'étude de la stabilité physico-chimique des mélanges d'atelocollagène et de hyaluronate de sodium.</li> </ul> |
| <p>L'étude des effets du mélange et de la coprécipitation dans des systèmes atelocollagène – polysaccharides</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'obtention de mélanges réticulés atelocollagène – polysaccharides, stables du point de vue physico-chimique.</li> <li>- L'étude rhéologique des mélanges obtenus.</li> <li>- L'étude de la réactivité physico-chimique des mélanges obtenus.</li> <li>- L'étude de la morphologie des cryogels générés à partir des mélanges obtenus.</li> </ul>  |
| <p>L'étude de la cytocompatibilité des substrats obtenus des mélanges atelocollagène - polysaccharides</p>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- L'élimination avancée de sels des substrats obtenus à partir des mélanges réticulés d'atelocollagène et polysaccharides.</li> <li>- Le conditionnement biochimique des substrats.</li> <li>- La mise à l'épreuve de la cytocompatibilité par la culture cellulaire.</li> </ul>   |

### **Résultats potentiels**

- L'obtention de cryo- et vitri-gels atelocollagéniques, en association avec des polysaccharides.
- L'obtention de structures microfibrillaires agrégées, à porosité contrôlable.
- L'obtention de films et de substrats composites collagène-polysaccharides à comportement rhéo-mécanique contrôlable.

### **Applicabilité finale des résultats**

- La réalisation de substrats composites „cyto-favorables”, destinés aux études de l'ingénierie tissulaire, à composante scléroprotéique et polysaccharidique.
- La réalisation de substrats composites à rôle de vecteurs pharmacologiques, destinés au traitement des plaies cutanées et des brûlures.
- La réalisation de substituts composites microstructurés de la matrice extracellulaire, destinés aux contrôles *ex vivo* de l'agressivité physico-chimique des espèces pharmacologiques, de leurs intermédiaires et des composés de biodégradation obtenus *in vivo*.

### **Éléments d'originalité des études incluses dans la thèse**

- Le traitement (à la manière d'un ingénieur) de la formulation des mélanges d'atelocollagène et de polysaccharides, en vue de l'obtention de systèmes colloïdaux à composition et à caractéristiques reproductibles.
- La technique de génération des mélanges d'atelocollagène et de polysaccharides, par le mélange intime des composants, simultanément à l'induction de la réticulation, pendant l'écoulement turbulent à travers des tubes à diamètre réduit.
- L'évaluation physico-chimique et rhéologique, par des techniques avancées, des caractéristiques des mélanges d'atelocollagène et de polysaccharides.

### **Problèmes techniques à résoudre**

- La purification avancée des composés macromoléculaires utilisés.
- L'assurance d'un contenu minimal de sels dans les solutions colloïdales et dans les produits solides obtenus.
- L'établissement des gammes de concentrations dans lesquelles l'atelocollagène et les polysaccharides peuvent être mélangés afin de générer des systèmes colloïdaux homogènes ou hétérogènes sous contrôle (uni- ou hétéro-phasiques).
- L'établissement des formulations des mélanges stables contenant de l'atelocollagène et des polysaccharides.

- L'établissement de la méthodologie de conditionnement biochimique pour l'assurance de la survie cellulaire sur le substrat solide, sous cryogel, obtenu à partir des mélanges d'atelocollagène et de polysaccharides.



# Chapitre I. Applications biomédicales du système collagène

## – polysaccharide

### I.1. Composante collagénique

Les protéines sont des composés organiques macromoléculaires, à chaînes exclusivement linéaires, constituées d'acides aminés protéinogènes.

Le collagène est la plus abondante protéine structurale rencontrée dans la matrice extracellulaire (MEC). Celui-ci peut être présenté de deux points de vue:

1. du point de vue structurel, le collagène fait partie de la famille des collagènes fibrillaires qui présentent une structure secondaire;
2. du point de vue fonctionnel, le collagène a le rôle de conférer résistance [1–3] et d'assurer l'intégrité structurelle des tissus.

Le collagène a toujours été considéré une protéine importante [4, 5], nommée aussi scléroprotéine [6], grâce à son abondance dans l'organisme humain et à ses applications commerciales [7, 8]. Celui-ci représente la principale composante des tendons [9] et des ligaments [10], étant présent dans la peau [11], les artères, les cartilages [12] et la plupart des matrices extracellulaires [13], en proportion d'environ 25 – 30% du total de la masse protéique [14–16]. Cette unité protéique, si on se réfère à une molécule de collagène, est constituée de trois chaînes polypeptidiques  $\alpha$ , deux chaînes identiques, nommées  $\alpha 1(I)$  et une chaîne, nommée  $\alpha 2(I)$  [17, 18], qui contiennent des séquences répétées de  $(G-X-Y)_n$  [19, 20], où X représente la proline et Y l'hydroxyproline [21, 22].

#### I.1.1. Niveaux d'organisation moléculaire des collagènes fibrillaires

Comme beaucoup de protéines, le collagène est un composé macromoléculaire qui présente quatre niveaux d'organisation (Figure 1) dénommés: structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire [17].

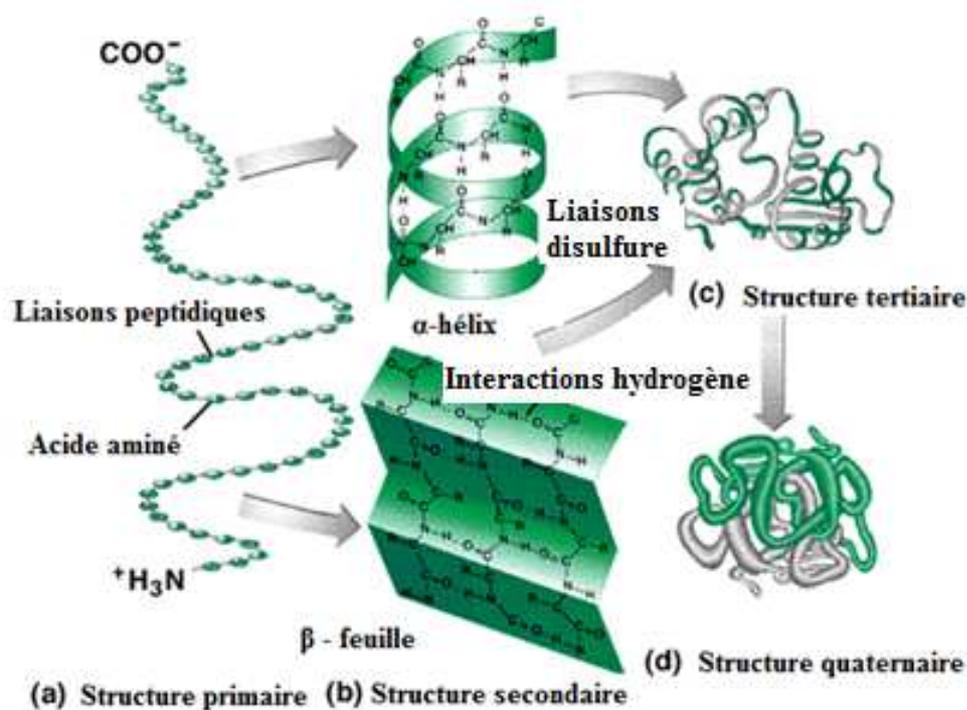


Figure 1. Niveaux d'organisation moléculaire du collagène fibrillaire.

#### I.1.1.1. Structure primaire

La structure primaire représente la structure de base de chaque protéine et présente le nombre, le type, la proportion et l'ordre des acides aminés dans la chaîne polypeptidique [23].

Celle-ci est caractérisée par:

- L'existence de liaisons peptidiques (-CO-NH-) entre différents acides aminés [24];
- L'existence d'une succession (des séquences bien définies des acides aminés dans les chaînes polypeptidiques) [25];

Elle détermine la structure tridimensionnelle et la fonction de la protéine [26].

#### I.1.1.2. Structure secondaire

La structure secondaire d'une protéine se réfère au pliage régulier des régions de la chaîne polypeptidique. Les 2 types les plus communs de structures secondaires sont l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$  [25].

#### I.1.1.3. Structure tertiaire

La formation de la structure tertiaire est le résultat des interactions qui ont lieu entre les résidus d'acides aminés des chaînes polypeptidiques, menant à la formation d'une structure sous

forme de boule ou globulaire. La stabilité de cette structure est donnée par les types de liaisons qui se forment:

- Des interactions hydrogène qui s'établissent entre le groupement carbonyle C=O (électronégatif) et le groupement NH- (électropositif), entre 2 chaînes polypeptidiques jointes;
- Des liaisons ioniques, réalisées entre les groupements polaires  $\text{-NH}_3^+$  et  $\text{-COO}^-$  de différents acides aminés. Le nombre des liaisons ioniques est relativement petit, parce que la plupart des groupements fonctionnels ionisés interagissent avec les dipôles de l'eau;
- Des liaisons de type dipôle - dipôle, établies entre les groupements  $\text{-OH}$  de la sérine et de la thréonine, des forces de van der Waals (des liaisons électrostatiques faibles qui s'établissent entre les radicaux hydrophobes);
- Des liaisons covalentes formées par des „ponts disulfure” ( $\text{-S-S-}$ ) entre les radicaux de cystéine [25].

#### **I.1.1.4. Structure quaternaire**

La structure quaternaire caractéristique aux protéines natives représente le plus haut niveau d'organisation moléculaire. La structure quaternaire représente l'association de quelques chaînes polypeptidiques identiques, nommées protomères (qui ont déjà une structure primaire, secondaire et tertiaire définie) dans un ensemble (agrégé) dénommé oligomère. En fonction du nombre de protomères (qui peuvent être identiques ou différents) les protéines oligomères peuvent être dimères, trimères, tétramères [23].

#### **I.1.2. Biosynthèse du collagène**

Comme toute autre protéine, les collagènes fibrillaires sont biosynthétisés dans les cellules fibroblastes du tissu conjonctif en deux étapes: intracellulaire et extracellulaire [27]. Le processus commence dans les fibroblastes et finit avec l'agrégation des fibrilles dans des fibres – composantes de la matrice extracellulaire (MEC) [28].

Les cellules fibroblastes ont un rôle important autant dans la synthèse intracellulaire des molécules de collagène que dans celle extracellulaire où a lieu la formation des fibrilles et le développement de la matrice extracellulaire spécifique à chaque type de tissu conjonctif. [29].

Ce processus de biosynthèse implique un nombre inhabituellement grand de modifications de co-translation et post-translation, beaucoup d'entre elles étant uniques pour le collagène et autres protéines ayant des domaines identiques au collagène [30].

### **I.1.3. Classification des formes collagéniques**

Les formes collagéniques peuvent être classifiées du point de vue taxonomique en fonction de:

1. la source d'origine;
2. le degré d'écart de l'état natif des espèces collagéniques;
3. la composante générale;
4. le niveau et le degré de structuration moléculaire et supra-moléculaire.

La famille des protéines collagéniques est classifiée en sous-familles en fonction de la structure moléculaire et supramoléculaire, en [31, 32]:

1. Collagène fibrillaire: types I, II, III, V et XI;
2. Collagène type réseau: types IV, VIII et X;
3. Collagène d'association fibrillaire: types IX, XII, XIV, XVI et XIX;
4. Collagène transmembranaire: types XIII et XVII;
5. Autres types de collagène.

En fonction de la structure chimique, les matériaux collagéniques peuvent être classifiés en [33]: fibres de collagène, atelocollagène, collagène natif, collagène solubilisé, gélatine et hydrolysats de collagène.

### **I.1.4. Propriétés physico-chimiques des formes collagéniques**

#### **I.1.4.1. Propriétés mécaniques du collagène**

Le comportement mécanique et physico-chimique du collagène est dû au dualisme de sa structure, cristalline et amorphe. Ses propriétés mécaniques contiennent des éléments d'élasticité, viscosité et plasticité [34].

Les propriétés mécaniques des tissus de collagène dépendent beaucoup de la formation des liaisons intermoléculaires croisées entre les molécules de collagène des fibres [35].

Avec l'âge, le collagène subit des variations successives très semblables d'un individu à l'autre et d'une espèce de mammifères à l'autre. Les variations comprennent une croissance continue de collagène qui devient plus strictement organisé par la contribution des liaisons inter- et intramoléculaires. Pour la plupart des espèces ce développement est considérablement ralenti après avoir atteint l'âge de la maturité.

#### **I.1.4.2. Propriétés thermiques du collagène**

L'influence de la température sur le collagène se manifeste par le phénomène de contraction à une certaine température, nommée température de contraction. La contraction n'a

pas lieu brusquement à une température donnée, mais c'est un processus lent qui peut être prévu dans le temps, au fur et à mesure de la rupture des liaisons intermoléculaires [36].

Dans un intervalle de température compris entre 58 et 65°C la déformation des fibres de collagène a lieu et leur raccourcissement d'un tiers de leur longueur [34]. Par augmentation du degré de gonflement du collagène, la température de contraction diminue, et par déshydratation, elle augmente.

#### **I.1.4.3. Biodégradation des collagènes**

La biodégradation est une caractéristique importante des collagènes, parce que ce processus mène à l'affectation des propriétés du polymère (poids moléculaire, liaisons polypeptidiques, degré de gonflement, etc.)

Dans des conditions physiologiques normales, les collagènes sont dégradés par les soi-disant collagénases selon un processus qui s'effectue lentement et de manière contrôlée. Dans différentes affections, la dégradation du collagène peut avoir des effets dramatiques.

Le processus de dégradation a lieu en trois étapes:

- le gonflement du matériel à cause du contact avec le milieu environnant;
- la pénétration de l'enzyme dans la structure du collagène;
- l'action catalytique de l'enzyme sur la chaîne polypeptidique. La

collagénase a une capacité catalytique sur la région de la triple hélice en état non dénaturé, à la température et au pH physiologiques.

La présence de ces produits de dégradation enzymatique se quantifie par des méthodes colorimétriques, viscosimétriques, microscopiques ou chromatographiques.

#### **I.1.5. Applications du collagène**

L'utilisation du collagène comme biomatériau présente aussi bien des avantages que des désavantages.

Avantages:

1. Disponible en abondance [37] et facile à purifier [17, 38] à partir des organes vivants (il constitue plus de 30% des tissus des vertébrés);
2. Biodégradable [39] et biorésorbable;
3. Non toxique [17] et biocompatible [40, 41];
4. Synergie avec les composantes bioactives;
5. Plastique biologique grâce à la grande résistance à la traction;
6. Il promeut fortement la prolifération des cellules [1];
7. Hémostatique – promeut la coagulation sanguine [42];

8. La biodégradabilité peut être réglée par la réticulation [43];
9. Facile à modifier afin de produire des matériaux souhaités par l'utilisation de ses groupements fonctionnels [42];
10. Compatible avec les polymères synthétiques [44];
11. Immunogénicité réduite [45].

Désavantages:

1. Difficulté d'obtenir le collagène pur de type I [46];
2. Hydrophilie, qui mène au gonflement et une libération plus rapide [47];
3. Grand degré de dégradation, qui mène rapidement à la perte des propriétés mécaniques, par l'ajout de cristaux minéraux ou par la combinaison avec des polymères, naturels d'une part, comme par exemple, l'élastine, et glycosaminoglycanes ou synthétiques, d'autre part, comme des dérivés de méthacrylate, ou par l'application de méthodes différentes de réticulation [4];
4. Propriétés complexes de manipulation;
5. Réactions adverses, comme BSF (encéphalopathie bovine spongiforme) et la minéralisation [47];
6. La structure hélicoïdale du collagène affecte la croissance des fibroblastes, la morphologie [40].

Le collagène de type I a été largement étudié pour différentes applications biomédicales. Beaucoup de techniques ont été exploitées pour imiter les structures nanofibrillaires *in vitro*, pour des constructions d'ingénierie tissulaire, soit de polymères synthétiques ou naturels, comme l'électrospinning, la séparation de phase et l'auto-assemblage. [48].

Le motif principal pour lequel le collagène est utilisé dans les applications biomédicales est le fait que le collagène peut former des fibres résistantes et stables par auto-agrégation et réticulation. [47].

Le collagène peut être utilisé dans différentes domaines comme par exemple:

1. **Stomatologie:** la régénération parodontale, des matériaux de restauration, dents artificielles.
2. **Ophthalmologie:** comme des greffes de remplacement de la cornée, des matériaux de suture, lentilles, bandages, pansements, solutions visqueuses, des substituts vitreux ou protecteurs pendant l'intervention chirurgicale, etc. [49].
3. **Chirurgie cardiovasculaire:** prothèses vasculaires, composantes du coeur artificiel.
4. **Applications du collagène en pharmacie et cosmétique:** vecteur de certaines substances, crèmes et émulsions à action d'hydratation.

5. **Applications en orthopédie:** greffes de tissu osseux, gels réticulés substitués de liquide synovial, prothèses de tendon et cartilage.

## I.2. Composante polysaccharidique

Les polysaccharides, nommés aussi glycanes, sont constitués d'un ou plusieurs types de molécules monosaccharidiques. Le monosaccharide le plus commun étant le D-glucose, mais à part celui-ci les D-fructose, D-galactose, L-galactose, D-mannose, L-arabinose et D-xylose peuvent aussi exister [50].

### I.2.1 Polysaccharides communs

#### I.2.1.1. Chitine et chitosane

La chitine et le chitosane sont des aminopolysaccharides naturels qui possèdent des propriétés multidimensionnelles, des structures uniques et des fonctions extrêmement sophistiquées [51]. La chitine est un des plus abondants polysaccharides [52] tout comme la cellulose, pourtant à cause de son insolubilité dans l'eau, son utilisation dans de nombreux domaines est limitée [53] Facilement obtenu par la désacétylation alcaline de la chitine (Figure 2) [54] en 1859, le chitosane est un polysaccharide cationique (en milieu acide dilué) qui contient des unités répétitives de 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose et 2-acétamido-2-deoxy-D-glucopyranose [55], liées entre elles par des liaisons de type  $\beta(1\rightarrow4)$  [56, 57].

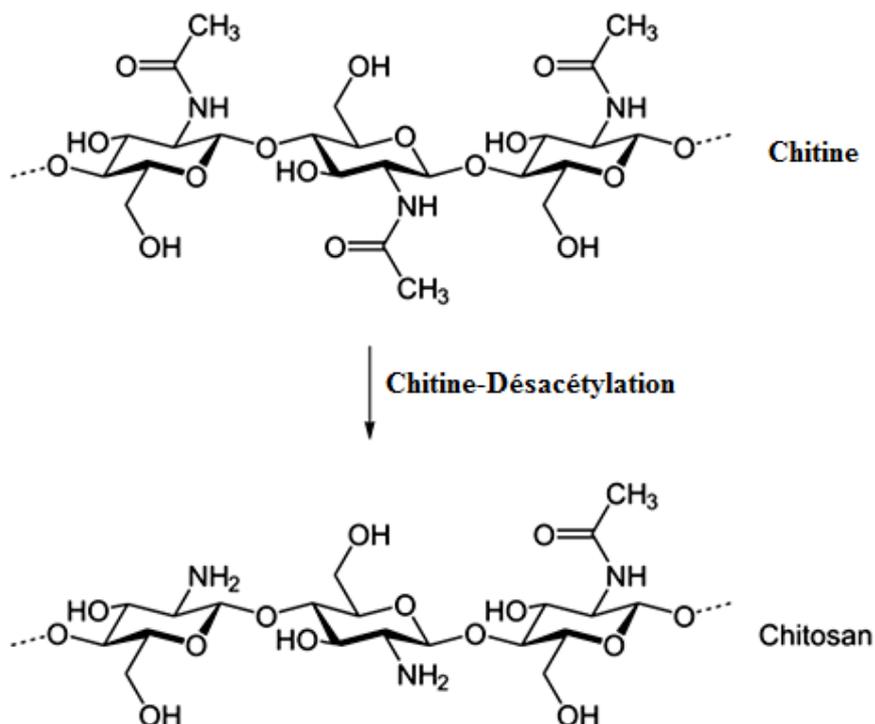


Figure 2. La structure chimique idéale de la chitine et du chitosane.

Les propriétés biologiques comme la biodégradabilité [56], la non-toxicité [58], une bonne biocompatibilité [59], l'activité hémostatique [60], et antimicrobienne [61], attirent l'intérêt scientifique et industriel dans des domaines comme l'ingénierie tissulaire [2], l'industrie pharmaceutique [9], cosmétique [62], l'agriculture [52], les systèmes de libération contrôlée de médicaments [63], l'industrie textile [64], l'industrie alimentaire, etc. [61, 65]. A part cela, le chitosane possède aussi des propriétés bactériostatiques et fongistatiques [66] qui sont utilisées pour le traitement des plaies [67]. En plus, le chitosane possède des propriétés de bioadhésivité, et ses dérivés sont biocompatibles et non toxiques avec les tissus vivants [50, 68]. Grâce à sa bonne bioadhésivité, le chitosane a été utilisé avec succès en stomatologie, orthopédie, ophtalmologie et dans les procédures chirurgicales [69].

Certaines des les applications médicales et pharmaceutiques du chitosane sont sous forme de lentilles de contact, bandages, peau artificielle, sutures chirurgicales, membranes, systèmes de libération contrôlée de médicaments [1, 16, 70].

Avec le temps, les hydrogels à base de chitosane ont trouvé des applications comme pansements pour brûlures, plaies, substituts temporaires de peau, qui accélèrent beaucoup le processus de guérison et de cicatrisation par rapport aux traitements standard.

Les membranes à base de chitosane ont été utilisées pour le rein artificiel, grâce aux propriétés de perméabilité et de résistance à la rupture.

### **I.2.1.2. Acide hyaluronique (hyaluronate de sodium, HA)**

Une composante importante de la matrice extracellulaire, outre le collagène, est l'acide hyaluronique [71]. Il a été isolé pour la première fois de l'humeur vitré de l'oeil de boeuf en 1934 par Meyer et Palmer [24, 72]. Toutefois, plus tard, il a été découvert dans tout le corps, surtout dans la matrice extracellulaire (MEC), le liquide synovial, le cordon ombilical, mais aussi dans le tissu cérébral [73].

L'acide hyaluronique (HA) est un polymère naturel linéaire [74, 75], polyanionique, composé de 2000 – 25000 unités disaccharidiques successives [76] d'acide D-glucuronique et N-acetyl-D-glucosamine unies par des liaisons alternées  $\beta$ -(1→3) et  $\beta$ -(1→4) glycosidiques [77] (Figure 3), qui lui confèrent un caractère hydrophobe et hydrophile [78–80].

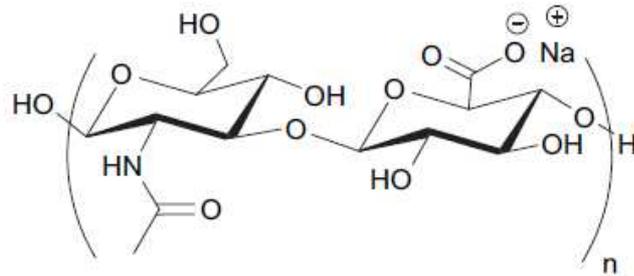


Figure 3. La structure chimique du hyaluronate de sodium.

Grâce à ses propriétés (non-toxique, biocompatible [81, 82]), l'acide hyaluronique est utilisé principalement en ophtalmologie (chirurgie oculaire, substituts vitreux, gouttes), rhumatologie (traitement de l'arthrite [83]), traumatologie, dermatologie (kératoses actiniques, pansements cicatrisants), odontologie (traitement de la périodontite), etc. Il est utilisé en tant que biomatériau viscoélastique en cosmétique grâce à sa grande capacité de rétention de l'eau, mais aussi dans les systèmes à libération contrôlée de médicaments grâce à sa biodégradabilité. HA est impliqué dans la migration et dans la différenciation des cellules, et c'est la première macromolécule qui apparaît dans les MEC au cours de la réparation du tissu. L'ajout de HA promeut la division cellulaire dans les fibroblastes humains [1].

### I.2.1.3. Gomme gellane

La gomme gellane est un polysaccharide extracellulaire anionique, produit par la fermentation de *Pseudomonas Elodea*. Il a été décrit initialement par Moorhouse et ses collaborateurs [84], comme étant formé de quatre unités répétitives de  $\beta$ -D-glucose,  $\beta$ -D-acide glucuronique et  $\alpha$ -L-ramnose en rapport de 2:1:1 [85] (Figure 4).

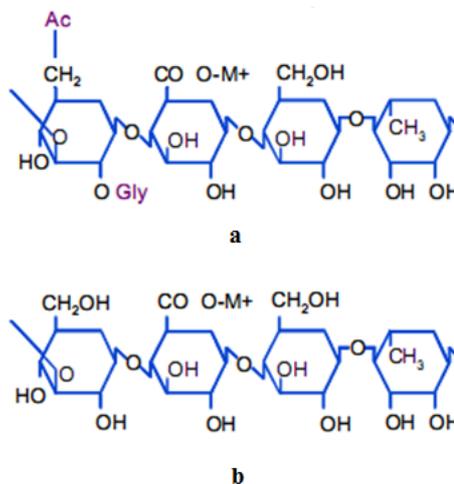


Figure 4. La structure chimique du gellane.

Les solutions de gomme gellane forment des gels en présence de cations polyvalents. Ces propriétés ont été exploitées dans l'industrie pharmaceutique et biomédicale pour la libération contrôlée de médicaments. La stabilité mécanique des gels réticulés ioniquement est assurée par les cations bivalents, comme celles de calcium [86].

Oliveira et ses collaborateurs ont démontré que les hydrogels à base de gellane sont bien adaptés pour le soutien du développement chondrocyte. Ciardelli et ses collaborateurs ont démontré que le gellane en mélange avec la polycaprolactone est un matériel adéquat pour l'ingénierie tissulaire [87].

### **I.3. Modalités d'association des protéines (du collagène) avec les polysaccharides**

Les types de liaisons qui peuvent exister entre les molécules de protéines et polysaccharides sont les liaisons covalentes, le produit obtenu étant un "conjugué" fort et permanent [88–90] ou les interactions non-covalentes (interactions électrostatiques et/ou hydrophobes, exclusion stérique, interactions hydrogène, etc) [91].

Les mélanges protéines-polysaccharides peuvent être influencés par 4 facteurs: le pH, la structure des composants [92], la force ionique et le rapport de mélange.

La production et l'utilisation avec succès des matériaux obtenus à partir de mélanges de protéines-polysaccharides supposent que leurs propriétés, incluant les interactions intermoléculaires, la miscibilité, la morphologie et la compatibilité, soient bien connues [93].

Les mélanges de protéines amorphes et polysaccharides peuvent être produits par le mélange des solutions de biopolymère par dessèchement, pulvérisation ou par refroidissement rapide et enlèvement de l'eau, c'est-à-dire lyophilisation. Les solutions mixtes de biopolymères sont, d'habitude, instables; après la préparation, en général ils mènent à séparation de phases à cause de l'incompatibilité thermodynamique. Ce phénomène est le résultat de certaines barrières d'enthalpie et d'entropie causées par la dimension et l'incompatibilité chimique de différents biopolymères [94].

Les interactions majeures non-covalentes entre protéines et polysaccharides sont:

➤ Interactions électrostatiques. Cette interaction est importante pour les biopolymères qui ont une charge électrique dans les conditions où ils sont utilisés (pH et force ionique). Elles peuvent être attractives ou répulsives, en fonction du fait si les charges des groupements impliqués ont des signes différents ou similaires. La force de ces interactions diminue avec l'augmentation de la force ionique.

➤ Exclusion stérique. Le volume relativement grand occupé par beaucoup de biopolymères en solution signifie que les effets d'exclusion stérique sont importants. Plus exactement, il y a

une réduction de l'entropie de mélange du système grâce à la réduction du volume disponible pour l'occupation par les molécules de biopolymères.

➤ Interactions hydrophobes. Cette interaction est importante pour les biopolymères en solution aqueuse qui ont des groupements non-polaires, et se manifestent comme une tendance pour les groupements non-polaires à s'associer les uns avec les autres.

➤ Interactions hydrogène. Cette interaction est importante pour les biopolymères qui ont tout au long de la chaîne des segments qui peuvent former des interactions hydrogène relativement fortes avec les segments d'autres molécules, par exemple, par l'intermédiaire des structures hélicoïdales [95].

L'importance relative de ces interactions, dans un système particulier, dépend du type de molécules de biopolymères impliquées (par exemple, le poids moléculaire, la densité vis-à-vis du pH, la flexibilité), la composition de la solution (par exemple, le pH et le pouvoir ionique) et les conditions de milieu environnant (par exemple, la température). Par la modulation de ces paramètres, le contrôle des interactions entre biopolymères devient possible, et, par la suite, la création d'attributs fonctionnels différents dans un système.

#### **I.4. Applications des systèmes protéines – polysaccharides**

Les mélanges de collagène, un matériel biologique appliqué comme biomatériau dans le domaine de la médecine, avec des polymères synthétiques ou naturels, peuvent trouver des applications intéressantes pour le développement des matériaux qui nécessitent un certain niveau de conductivité électrique [96], comme par exemple dans la stimulation de l'ostéoconductivité, la régénération des nerfs ou l'hémocompatibilité des biomatériaux par la modification de la surface [47, 97].

Le collagène est un biomatériau important et, grâce à ses propriétés, il est utilisé sous forme de prothèse, tissu artificiel, systèmes à libération contrôlée de médicaments, cosmétique, etc. [47].

Les mélanges collagène–chitosane sont utilisés à une grande échelle comme biomatériaux dans les domaines pharmaceutique et médical [98, 99]. Ils sont préparés par réticulation [100] ou lyophilisation [101]; cependant l'obtention des mélanges se réalise à l'échelle macroscopique [9].

Lin et Liu [102] ont constaté que pour un mélange d'éponges qui contiennent du collagène et hyaluronane, la résistance mécanique et la biostabilité sont plus grandes que pour les composants du mélange pris individuellement.

Par ailleurs, Pietrucha a montré que l'implantation d'une matrice composée de collagène et hyaluronane dans des affections crâniennes des rats, démontre une bonne biocompatibilité et a prouvé un plus grand potentiel ostéoconductif [103].

# **Chapitre II. Obtention des hydrogels à base de collagène et des polysaccharides**

## **II.1 Introduction**

Les hydrogels sont des réseaux homopolymères ou copolymères [104] hydrophiles tridimensionnels [105, 106] qui ont la capacité d'absorber des quantités considérables d'eau [107, 108] ou de fluide biologique [109] de 10-20% [110] jusqu'à 80-90% par rapport à leur masse sèche, sans dissolution [111] ou perte de structure tridimensionnelle [112], en leur offrant des caractéristiques physiques similaires aux tissus mous [113, 114].

Le maintien de ces structures est dû aux liaisons formées après la réticulation de type chimique (covalentes) ou physique (réversibles) entre les chaînes polymères hydrophiles [115].

Les hydrogels sont une classe prometteuse de biomatériaux, parce qu'ils peuvent être facilement adaptés afin de produire les propriétés mécaniques et chimiques souhaitées qui se ressemblent avec celles de la matrice extracellulaire native et présente une grande perméabilité pour l'oxygène, les nutriments, et autres métabolites solubles dans l'eau [115].

## **II.2. Classification des hydrogels**

La classification des hydrogels peut être faite de plusieurs points de vue:

1. du point de vue morphologique;
2. en fonction de la nature des groupements latéraux;
3. en fonction des méthodes de préparation;
4. en fonction de la structure physique des réseaux;
5. d'après la nature du matériau polymère;
6. en fonction de la dimension des pores;
7. en fonction des forces impliquées dans la construction du réseau;
8. en fonction de l'évolution dans l'organisme.

## **II.3. Méthodes d'obtention des hydrogels**

Les caractéristiques et les applications potentielles des hydrogels sont toujours corrélées avec leurs méthodes d'obtention. Les hydrogels peuvent être autant obtenus par des méthodes chimiques que physiques.

### **II.3.1. Obtention des hydrogels par réticulation chimique**

L'obtention de gels réticulés chimiquement peut être réalisée par [116]:

1. Réticulation par polymérisation radicalaire, par exemple, des groupes méthacrylate attachés aux polymères hydrophiles;
2. Réticulation avec des radiations de haute énergie;
3. Réticulation par le biais d'enzymes;
4. Réticulation par l'intermédiaire des groupements fonctionnels:
  - a. Réticulation avec les aldéhydes;
  - b. Réticulation par réactions d'addition;
  - c. Réticulation par réactions de condensation.

### II.3.2. Obtention des hydrogels par réticulation physique

L'obtention de gels réticulés physiquement peut être réalisée par [116]:

1. Réticulation par des interactions ioniques [117]
2. Réticulation physique des hydrogels par l'intermédiaire des copolymères à bloc amphiphiles et des copolymères greffés;
3. Réticulation par cristallisation:
  - i. Cristallisation dans des systèmes homopolymères;
  - ii. Réticulation par formation de stéréocomplexes.

### II.4. Propriétés des hydrogels

Pour des applications biomédicales et pharmaceutiques, les hydrogels biodégradables doivent présenter une série de propriétés, telles que:

#### II.4.1. La capacité d'absorption/incorporation de fluides

La capacité de rétention de l'eau des hydrogels apparaît en principe à cause de la présence des groupements hydrophiles, par exemple les groupements amino, hydroxyl, carboxyl des chaînes de polymères [118].

Cette propriété peut être décrite à l'aide de l'équation suivante:

$$Q_m = \frac{m_s - m_d}{m_d} \cdot 100 (\%)$$

où:

$Q_m$  – degré de gonflement;

$m_s$  – la masse de l'hydrogel gonflé;

$m_d$  – la masse de l'hydrogel sec.

Le processus de gonflement est influencé par certains facteurs:

1. la quantité de réticulant – lorsque la quantité de réticulant augmente, le gonflement diminue et en même temps mène à une diminution de l'élasticité du réseau de polymères et implicitement à une diminution de la capacité de gonflement [119];
2. la structure chimique du polymère (la porosité) peut affecter aussi le gonflement des hydrogels. Les groupements hydrophobes collapsent en présence de l'eau, en minimisant ainsi leur exposition à la molécule d'eau par rapport aux hydrogels qui contiennent des groupements hydrophiles [120];
3. la force ionique – [120];
4. le pH affecte le gonflement des hydrogels [121];
5. la température [121];
6. les paramètres du réseau;
7. les techniques de séchage [122].

#### **II.4.2. Biodégradabilité des hydrogels**

Le processus de dégradation peut être provoqué chimiquement ou biologiquement, en fonction du type d'agent qui agit catalytiquement sur la chaîne polymère. La biodégradation dépend de l'action dégradante des microorganismes, et en spécial des enzymes, sur les chaînes polymères. La biodégradation affecte les propriétés d'un hydrogel par l'action directe sur la chaîne, en affectant les liaisons chimiques, la cristallinité, le poids moléculaire, le degré de gonflement, etc. Le degré de biodégradation des hydrogels est possible à poursuivre seulement dans le cas des hydrogels à base de polymères naturels – polymères biodégradables.

#### **II.4.3. Cytotoxicité**

La cytotoxicité représente une propriété essentielle des hydrogels. On l'étudie en présence d'une culture cellulaire [121, 123]. Ainsi, l'échantillon à analyser est immergé pour une période de plus de 7 jours dans une culture de cellules. La viabilité cellulaire se détermine d'après quelques standards (standard MTT assay). Le test à l'aide d'une solution MTT se réalise à 37°C et sous une concentration de CO<sub>2</sub> de 5%, en absence de la lumière. Pendant l'incubation la solution jaune de MTT se transforme en cristaux insolubles violets, fait qui est possible en présence de l'enzyme mitochondrial déhydrogénase sécrétée par les cellules vivantes et viables. Après la solubilisation on lit l'absorbance sur la base de laquelle on détermine le nombre de cellules vivantes, en utilisant de la solution de monomère comme référence [119].

#### **II.4.4. Perméabilité**

Cette propriété des hydrogels est déterminée principalement par l'hydrophilie et par le degré de réticulation. La perméabilité est très importante dans le cas des systèmes à libération contrôlée des principes biologiquement actifs et dans le cas des systèmes profilés comme membranes. Une autre application pour laquelle cette propriété est très importante concerne les bandages cicatrisants qui devraient assurer l'oxygénation du tissu.

#### **II.4.5. Adaptabilité aux procédures de stérilisation**

Dans le cas des hydrogels biodégradables utilisés comme systèmes implantables cette propriété est très importante. La modification du système doit permettre une voie facile de stérilisation de ces systèmes, toutefois le processus de stérilisation ne doit pas altérer les propriétés fonctionnelles du système.

### **II.5. Applications biomédicales des hydrogels**

Grâce à leur capacité de retenir une quantité significative d'eau [124], les hydrogels ressemblent assez bien aux tissus naturels vivants, ce qui les rend utiles pour une large gamme d'applications biomédicales [109], comme les systèmes à libération contrôlée de médicaments [125], l'ingénierie tissulaire [126], les lentilles de contact [121], les implants cornéens [114], les couvertures synthétiques pour le soin des plaies [127], les biocapteurs [128], les matériaux dentaires, implants, systèmes injectables de polymères, matériaux hybrides (encapsulation des cellules vivantes) [118].

**II.5.1. Applications ophtalmologiques:** lentilles de contact, implants oculaires, substituts du corps vitré.

**II.5.2. Systèmes à libération contrôlée de médicaments**

**II.5.3. Pansements pour les plaies:** les pansements stériles Neoheal et Burntec, bandage Aquacel.

**II.5.4. Hydrogels pour l'ingénierie tissulaire**

Une branche importante de la médecine est représentée par l'ingénierie tissulaire grâce à sa capacité à réaliser des substituts avec des propriétés similaires aux tissus natifs [129]. Le but principal de ces applications est la restauration, l'entretien et/ou l'amélioration des fonctions des

os, des cartilages, des tendons, des ligaments, de la peau, des vaisseaux sanguins et des valves cardiaques. Un rôle important dans l'ingénierie tissulaire *in vitro* est joué par les constructions "scaffold" avec le rôle de soutenir l'adhésion, la migration, la différenciation, la prolifération des cellules. Pour la fabrication des hydrogels utilisés dans l'ingénierie tissulaire tant des polymères synthétiques (polyuréthanes, poly(oxyde d'éthylène), poly(alcool vinylique), poly(acide acrylique) que naturels (agar, alginate, chitosane, collagène, gélatine, acide hyaluronique, etc.) ont été utilisés.

Les propriétés physiques spécifiques pour de telles applications incluent les caractéristiques mécaniques, tout comme le comportement à la dégradation. Dans les hydrogels, ces propriétés sont décrites par les propriétés intrinsèques du polymère et les caractéristiques de réticulation (par exemple la quantité, le type et la dimension des molécules réticulantes), tout comme les conditions de milieu environnant [130]. En même temps ces hydrogels doivent accomplir aussi d'autres fonctions cellulaires comme l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire.

Les caractéristiques principales de ces hydrogels qui les rendent toujours plus attirants pour de telles applications sont [119]:

- a. la facilité de transformation des polymères;
- b. les propriétés des hydrogels peuvent être adaptées très facilement;
- c. les polymères résorbables, comme l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), et leurs copolymères (PLA-co-PGA, PLGA) ont été utilisés pour des applications biomédicales depuis longtemps. La méthode de stérilisation reste toutefois un problème important de ces hydrogels [131].

**II.5.5. Applications des hydrogels dans l'industrie alimentaire:** membranes, différentes formes d'adjuvants.

**II.5.6. Applications des hydrogels en agriculture:** bio-fertilisants.



## Chapitre III. Matériaux et méthodes

### III.1. Extraction et Purification de l'atelocollagène

Le processus d'extraction et de purification de la matière première (le collagène) du tendon de jeunes bovins, a été réalisé et breveté dans notre laboratoire [132,133] en parcourant les étapes suivantes:

- la transformation préalable des tendons, en vue de leur stérilisation et de leur stabilisation, afin d'assurer leur stockage temporaire, mais aussi d'éviter l'altération et /ou l'attaque bactérienne ou fongique;
- le défibrage physico-mécanique des tendons, par la déstructuration des épi- et des endotendons, suivie par la séparation et l'élimination d'une grande quantité d'élastine;
- le défibrage physico-mécanique des tendons, par l'application successive de quelques chocs alternatifs, hyper- et hypotoniques, puis de quelques chocs osmotiques induits par des sauts de pH dans des conditions de tampon dans la plage isoélectrique et respectivement loin de celle-ci, suivie par l'hydrolyse enzymatique des protéines dépourvues de collagène, l'élimination des débris tissulaires et, finalement, des glycosaminoglycanes;
- la solubilisation enzymatique du collagène et l'obtention de l'atelocollagène brut, en utilisant de la pepsine et en appliquant des traitements physiques de étirage et d'ultrafiltration, afin de générer, finalement, une solution colloïdale d'atelocollagène, auprès de formes collagénique diversement altérées par dénaturation et hydrolyse partielle;
- l'élimination du potentiel immunogène de l'atelocollagène, par traitement alcalin énergétique, dans des conditions de protection contre l'hydrolyse des groupements amide des restes d'acides aminés latéraux, par l'agglomération du milieu aqueux avec des polymères inertes [poly (éthylène glycol)];
- la purification primaire de la solution colloïdale d'atelocollagène, par précipitation sélective répétée et remise en suspension dans des solutions avec des caractéristiques imposées, qui sont ensuite soumises à la étirage, à l'ultrafiltration et à la diafiltration, avec le changement répété du milieu aqueux;
- la purification avancée de la solution d'atelocollagène hypoimmunogène, soldée avec l'obtention de l'atelocollagène biologiquement-actif, en appliquant un ou plusieurs processus de micro-fibrillation contrôlée, par lesquels nous isolons juste la fraction d'atelocollagène capable de reconstitution; finalement, nous appliquons des étirages, des ultrafiltrations et des diafiltrations répétées à la solution d'atelocollagène biologiquement-actif afin d'éliminer toutes

les fractions protéiques, les espèces chimiques et les impuretés indésirables ou à effet parasite dans les applications visées;

- le conditionnement chimique et biochimique de l'atelocollagène biologiquement-actif par l'introduction contrôlée dans le système colloïdal de certaines espèces micro- et macromoléculaires en concordance avec la gamme d'applications visée; nous ajoutons aussi des composants qui vont assurer le stockage et le maintien dans le temps de la stérilité du produit.

### **III.2. Obtention de la solution standard d'atelocollagène, d'hyaluronate de sodium et de gellane**

Afin d'être utilisées avec succès dans nos expériences, les solutions d'atelocollagène, d'hyaluronate de sodium et de gellane ont été standardisées de la manière suivante:

1. Afin d'obtenir la solution standard d'atelocollagène contenant 1 g/L de substance sèche, la solution colloïdale initiale a été soumise à diafiltration avec onze volumes de HCl 0,001 N à la température de 15°C (pour l'élimination complète des sels) étant, ensuite, soumise à la lyophilisation. La forme solide obtenue a été redissous dans une solution HCl 0,001 N et centrifugée pendant 30 minutes à 4 °C à une vitesse de 3600 rotations/minute. Le surnageant a été récupéré et ultrafiltré à l'aide d'une membrane de 100 kDa, et ensuite diafiltré contre onze volumes de HCl 0,001 N à 15 °C. Finalement, la solution colloïdale d'atelocollagène a été concentrée à 1 g/L en substance sèche, par ultrafiltration, sur une membrane de 100 kDa.

2. Avant d'être utilisé, l'hyaluronate de sodium a été dissous lentement dans de l'eau bi-distillée à température ambiante, puis la solution obtenue a été soumise à la filtration sur une membrane d'ultrafiltration dont la taille des pores est de 0,2 microns. Ensuite elle a été diafiltrée contre cinq volumes d'eau bi-distillée. La solution diluée a été lyophilisée, et la poudre obtenue a été redissoute dans de l'eau bi-distillée, et soumise ensuite à l'ultrafiltration sur une membrane de 100 kDa, suivie par une diafiltration contre onze volumes d'eau bi-distillée. La solution finale a été centrifugée pendant 30 minutes à 3600 rotations/min, et le surnageant a été concentré jusqu'à une concentration de 1 g/L en substance sèche par ultrafiltration à l'aide d'une membrane de 100 kDa. La masse molaire équivalente du hyaluronate dans la solution finale a été déterminée par SEC ( $M_w$  1303 kg/mol, indice de polydispersité de 1,96).

3. Tout comme dans le cas des autres composantes, le gellane a été dissous dans de l'eau bi-distillée, au bain marie, et la solution diluée a été refroidie à 25 °C. La solution obtenue a été filtrée sur une membrane d'ultrafiltration à porosité de 0,2 microns. Après quoi elle a été soumise à la diafiltration contre onze volumes de solution de triméthylamine dans de l'eau bi-distillée à une concentration de 12,5% g/L. La solution obtenue a été séchée par lyophilisation, et la forme solide obtenue a été dissoute lentement dans de l'eau bi-distillée à 25 °C, afin

d'obtenir un système colloïdal. Après centrifugation pendant 30 minutes à 3600 rotations/min, le surnageant a été ultrafiltré sur une membrane de 100 kDa, et ensuite diafiltré contre onze volumes d'eau bi-distillée, à 25 °C. La solution obtenue a été centrifugée à nouveau dans les mêmes conditions, puis le surnageant a été finalement concentré à une concentration de 1 g/L substance sèche, par ultrafiltration sur une membrane de 100 kDa. La masse molaire équivalente du gellane natif dans la solution finale a été déterminée par SEC ( $M_w$  3428 kg/mol par extrapolation, avec un indice de polydispersité de 1,79).

Les processus d'ultrafiltration et de diafiltration ont été effectués en régime de flux tangentiel, en utilisant un système Vivaflow 200 (Sartorius).

### **III.3. Caractérisation du sol d'atelocollagène**

Le but de cette caractérisation est de déterminer quantitativement les composants. La solution colloïdale obtenue a été caractérisée en déterminant:

1. le contenu de substances minérales totales (par calcination jusqu'à poids constant), étant de 0,335%;
2. le contenu d'azote (par la technique Kjeldahl) pour notre sol étant de 14,06;
3. le point isoélectrique (par titrage acido-basique et par turbidimétrie) étant de 7,8;
4. la masse molaire (par électrophorèse et chromatographie par perméation de gel). Les deux méthodes ont fourni environ la même valeur de la masse molaire; 286kDa dans le cas de l'électrophorèse, et 293kDa déterminée par SEC et un indice de polydispersité de 1,21.

### **III.4. Obtention d'hydrogels à base de collagène et de collagène-polysaccharide**

En vue de l'obtention des hydrogels, la solution d'atelocollagène à une concentration de 6 mg/mL est préparée à partir de collagène lyophilisé par dissolution dans une solution 0,1 M en NaOH, ajoutée goutte à goutte, tout en suivant la valeur du pH de la solution qui doit se situer aux environs de 10,2. Ensuite la solution d'atelocollagène est introduite dans le système de seringues S1-S2 et pompée alternativement, énergiquement, environ 20-30 fois (l'installation utilisée est présentée dans la Figure 5). Par l'intermédiaire de la seringue S3, on introduit dans le système l'agent de réticulation, formé par le mélange 1,4-butanediol diglycidyl éther avec un tensioactif cationique, le bromure de tétrabutylammonium. Les seringues "transporteuses" sont liées par l'intermédiaire d'un tube qui est immergé dans un bain d'eau glacée, pour protéger le groupement oxirane (époxy), dont la réactivité augmente beaucoup en même temps que la température. L'opération à basse température assure la réaction lente du cycle oxirane avec les groupements amine et acide latéraux, menant à une meilleure uniformité de l'hydrogel obtenu. Le mélange formé est ensuite extrait du système de pompage – dosage par l'intermédiaire de la

seringue S4, et il est thermostaté pendant 90 minutes à la température de 32°C, après quoi il est maintenu dans le frigidaire, pendant la nuit (environ 12 heures).

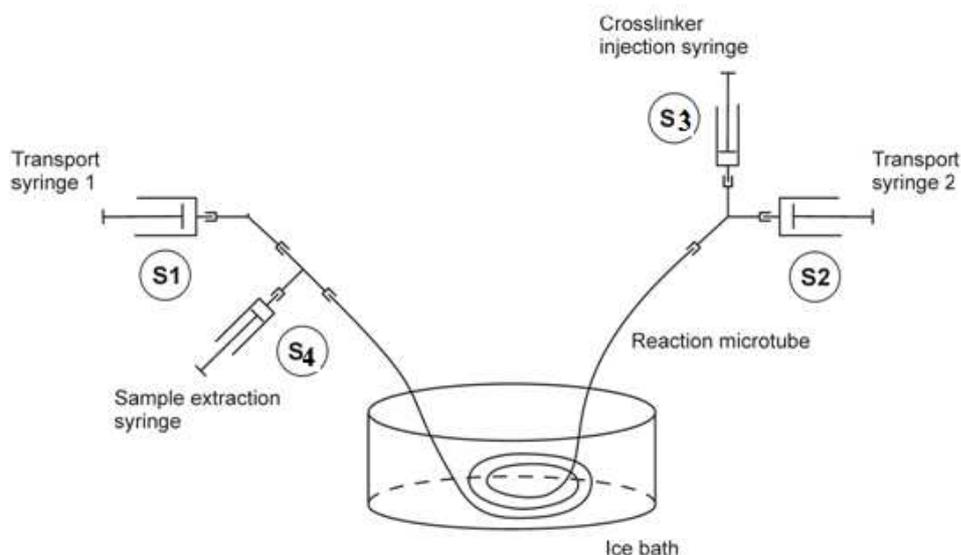


Figure 5. L'opération de pompage - dosage utilisé pour préparer des hydrogels.

En vue de l'obtention des hydrogels binaires, atelocollagène et hyaluronate de sodium, nous avons préparé une solution colloïdale d'atelocollagène avec les mêmes caractéristiques que dans le cas des hydrogels à base de collagène. Sur la solution ainsi préparée nous parsemons une quantité d'hyaluronate, cependant on laisse le système s'humecter uniformément. Après l'humectation complète de l'hyaluronate, nous mélangeons la composition lentement, tout en évitant la formation des bulles d'air. Nous laissons mûrir le mélange obtenu pendant 3 heures, à 4 °C, après quoi nous l'introduisons dans le système de seringues S1-S2 et nous appliquons ensuite la méthodologie de mélange et réticulation décrite pour l'obtention des hydrogels atelocollagéniques.

### III.5. Méthodes de caractérisation des hydrogels obtenus

Les hydrogels obtenus ont été caractérisés du point de vue physico-chimique en utilisant les méthodes suivantes:

- degré maximal de gonflement -  $Q_{max}$  (%);
- capacité de chargement des hydrogels avec du médicament;
- capacité de libération d'un médicament;
- Microscopie Electronique à balayage (Scanning Electron Microscopy, SEM);
- Spectroscopie RAMAN;
- Résonance magnétique nucléaire;
- Analyse thermique;

- ✓ calorimétrie différentielle à balayage;
- ✓ analyse thermogravimétrique;
- tests de biocompatibilité;
- étude rhéologique des solutions de collagène et polysaccharides des hydrogels obtenus:
  - ✓ étude rhéologique des solutions diluées de collagène et de polysaccharides;
  - ✓ étude rhéologique des hydrogels obtenus à base de collagène et de polysaccharides;
- étude des équilibres de phase dans les solutions de collagène et polysaccharides:
  - ✓ évaluation par turbidimétrie de la compatibilité;
  - ✓ élaboration des diagrammes de phase.



## **Chapitre IV. Obtention des mélanges reproductibles d'atelocollagène et de polysaccharides**

Dans le but de préparer des mélanges stables et reproductibles à long terme, nous devons étudier tant les recettes que les procédures de préparation des mélanges dilués initiaux. Dans ce qui suit nous allons vous présenter quelques techniques qui fournissent les conditions de formation des mélanges, ainsi que les paramètres de travail de ces processus.

### **IV.1. Investigation par turbidimétrie des solutions colloïdales des biopolymères naturels**

Dans les solutions colloïdales aqueuses, les biopolymères (atelocollagène, hyaluronane et gellane) présente tant des intra- que des inter-associations au niveau moléculaire, grâce aux modifications de température, de pH et de composition chimique [134-136]. Les processus d'agrégation peuvent être investigués par des mesures turbidimétriques, ou par absorption de la lumière à différentes longueurs d'ondes spécifiques [137].

Ces études ont été réalisées par titrage turbidimétrique des solutions d'atelocollagène, hyaluronate de sodium et de gellane standardisées. Toutes les déterminations ont été réalisées à la température ambiante à l'aide d'un titrateur automatique (DMS Titrino716, Metrohm) et un turbidimètre à fibre optique (PC 900, Brinkmann). Pour le processus de titrage nous avons utilisé des solutions d'hydroxyde de sodium et d'acide chlorhydrique 0,1N en partant du pH de la solution colloïdale jusqu'à pH 2 et respectivement 12.

Dans la Figure 6 on peut observer les courbes de titrage turbidimétrique pour les biopolymères étudiés en milieu acide comme en milieu basique.

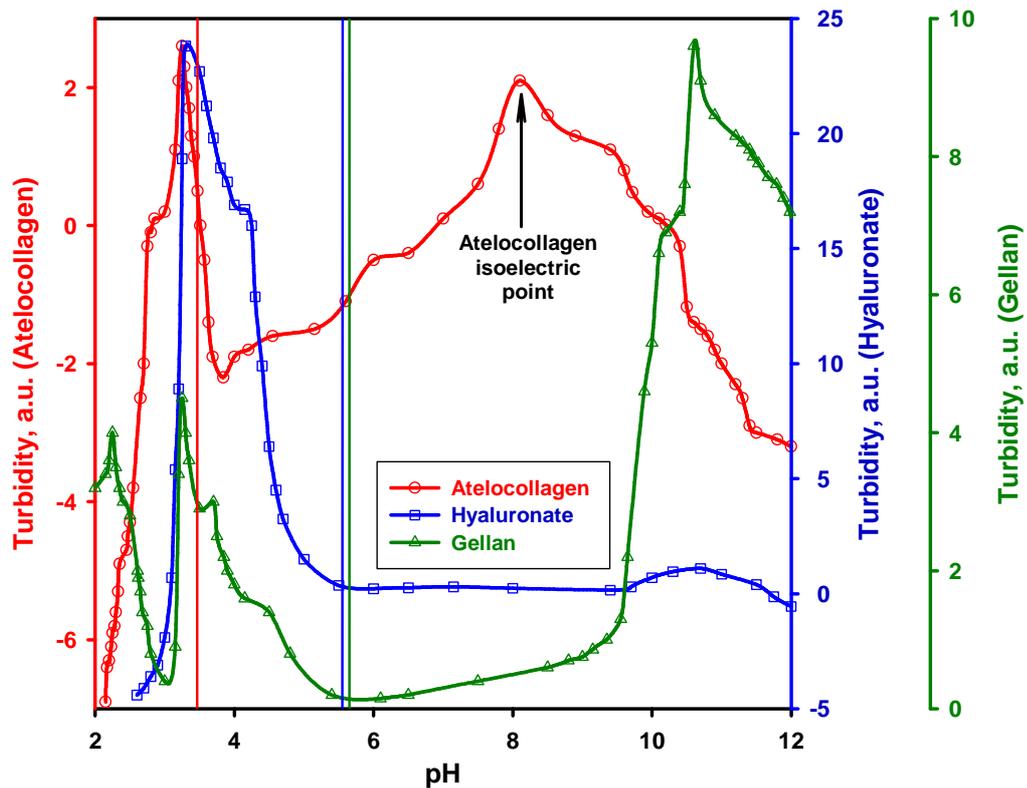


Figure 6. La représentation des courbes de titrage pour l'atelocollagène, le hyaluronate de sodium et le gellane. Les lignes verticales représentent la valeur initiale du pH de chaque solution.

L'amplitude des variations de turbidité diffère significativement entre les trois biopolymères naturels étudiés. Nous avons enregistré une augmentation importante dans le cas du hyaluronate de sodium, dont la valeur se situe aux environs de  $\text{pH}=4$ . En revanche, l'atelocollagène présente une évolution espérée de turbidité, les augmentations étant associées aux domaines de pH à faible solubilité (comme la gamme isoélectrique). De manière surprenante, trois domaines de croissance ont été mis en évidence dans l'évolution turbidimétrique de la solution de gellane pendant le titrage. Cette ultime observation pourrait être associée aux manières différentes d'empilement des chaînes de gellane natif, en corrélation directe avec le degré d'hydratation des agrégats.

Dans le but d'assurer un mélange intime de l'atelocollagène avec de l'hyaluronate de sodium et/ou de gellane, il faut choisir les domaines de pH qui présentent tant une grande solubilité individuelle que de la solubilité réciproque corrélée.

Le gellane est le composant qui impose les plus grandes contraintes, si l'on a en vue l'intervalle limité de solubilité (il est soluble aux valeurs du pH plus grandes de 5, dans de l'eau bi-distillée ou dans des tampons organiques, mais non pas dans de tampons salins). Les

domaines excessifs de gélification du gellane (au-dessus de la valeur de pH 10) doivent être évités aussi.

En comparant les courbes de titrage représentées dans la Figure 6, on constate que, la gamme de pH comprise entre 5 et 9 paraît être la plus faisable. Grâce au fait que, près du point isoélectrique de l'atelocollagène, le processus d'auto-association peut être promu, le domaine de pH compris entre 8 jusqu'à 9 reste le plus faisable, si l'on veut que dans le produit final on obtienne une morphologie fibrillaire.

#### **IV.2. Etude rhéologique des solutions diluées de biopolymères naturels**

Les mesures rhéologiques ont été effectuées en utilisant le viscosimètre Ubbelohde de type 0A, Ia, IIa et III (avec un volume de  $7,7 \pm 0,1$  mL et une longueur du capillaire de 90 mm), placé en bain thermostaté, à différentes températures, maintenues constantes sur toute la durée des mesures. Les temps d'écoulement des solutions ont été déterminés, à chaque fois, après 10 minutes de thermostatisation.

Pour ces déterminations nous avons préparé des solutions-mères de concentration égale à 0,40 g/dl à partir des solutions standardisées d'atelocollagène, d'hyaluronate de sodium et gellane, tout en utilisant pour ces mesures une série de dilutions de 0,32, 0,26, 0,22, 0,18, 0,14, 0,10, 0,06, 0,02, 0,01 g/dl préparées par ajout d'eau bi-distillée. Toutes les solutions diluées ont été soumises à la maturation pendant 12 heures, à 2 °C, et ensuite elles ont été séparées et soumises à la thermostatisation à la température de 15 °C. Les mesures ont été réalisées aux températures de 17, 20, 25, 30 et 35 °C. Pour les solutions diluées d'atelocollagène, les mesures ont été réalisées aussi à 40 °C, afin de mettre en évidence l'effet de dénaturation thermique.

La conformation des chaînes macromoléculaires et leur rigidité peuvent être estimées sur la base de mesures rhéologiques [138]. La Figure 7 présente comparativement la dépendance de la viscosité intrinsèque en fonction de température. Le système de coordonnées utilisé ( $\ln [\eta]$  par rapport à  $1/T$ ), permet l'estimation de la flexibilité des chaînes de macromolécules sur différents intervalles de température [139].

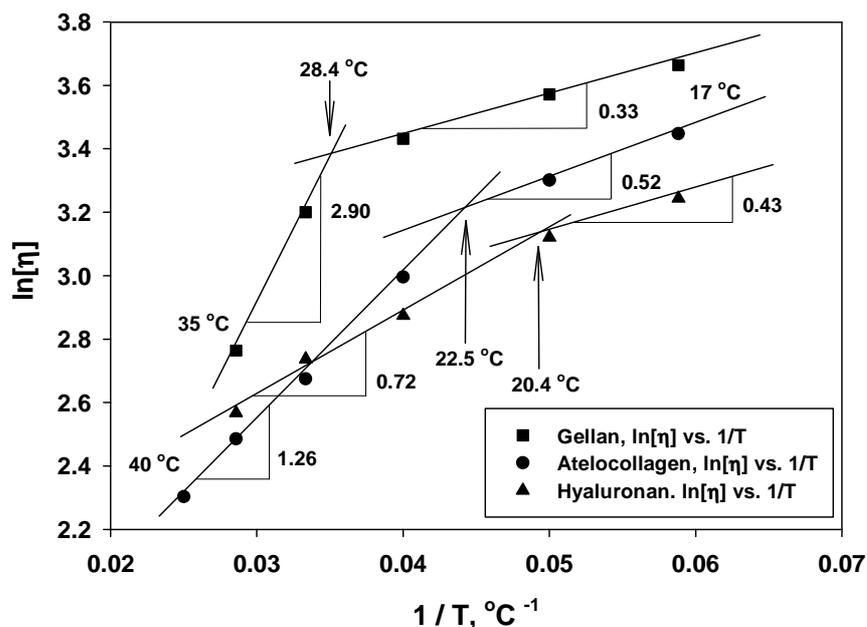


Figure 7. Variation de  $\ln[\eta]$  pour les solutions diluées d'atelocollagène, d'hyaluronate de sodium et de gellane en fonction de température.

Le gellane présente la plus grande variation (pour une pente normée de 0,33, aux températures inférieures à 28°C et une de 2,9 aux températures supérieures à ce seuil; une augmentation d'environ neuf fois). L'hyaluronate de sodium présente la plus petite variation de la flexibilité de chaînes en fonction de température (une augmentation d'environ 1,7 fois, aux environs de la valeur de 20°C), pendant que l'atelocollagène est placé dans une gamme intermédiaire de 2,4 fois, avec un seuil autour de la valeur de 22°C.

Pour obtenir des mélanges intimes en état colloïdal, la flexibilité des chaînes des macromolécules des composants doit être aussi proche que possible, et la variation en fonction de température doit être similaire, aussi. C'est la raison pour laquelle, dans le cas de mélanges d'atelocollagène avec de l'hyaluronate de sodium et/ou gellane, la température de travail devrait être maintenue dans un domaine inférieur à 20°C.

Les Figures 8 et 9 identifient et précisent les intervalles de concentrations faisables qui assurent le mélange favorable de l'atelocollagène avec de l'hyaluronate de sodium ou du gellane.

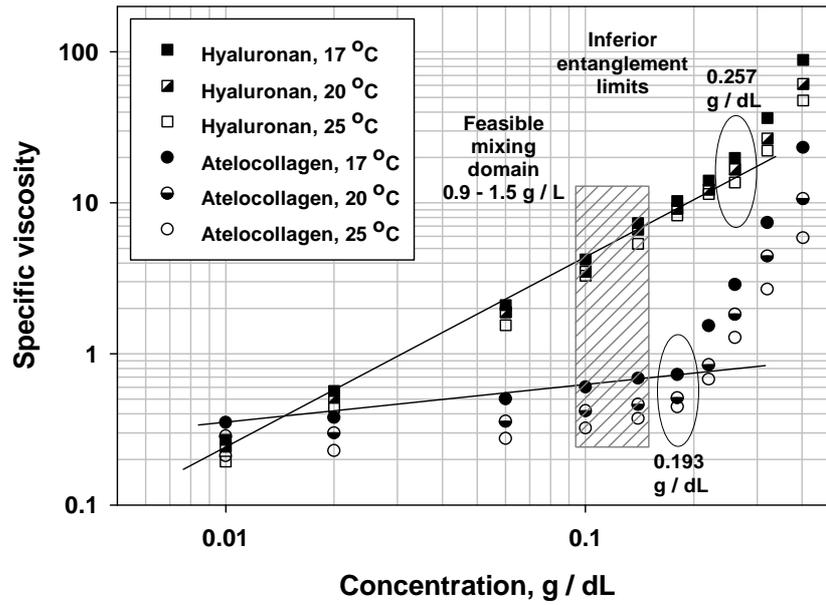


Figure 8. Le domaine de concentration optimal pour le mélange homogène des solutions d'atelocollagène et hyaluronate de sodium.

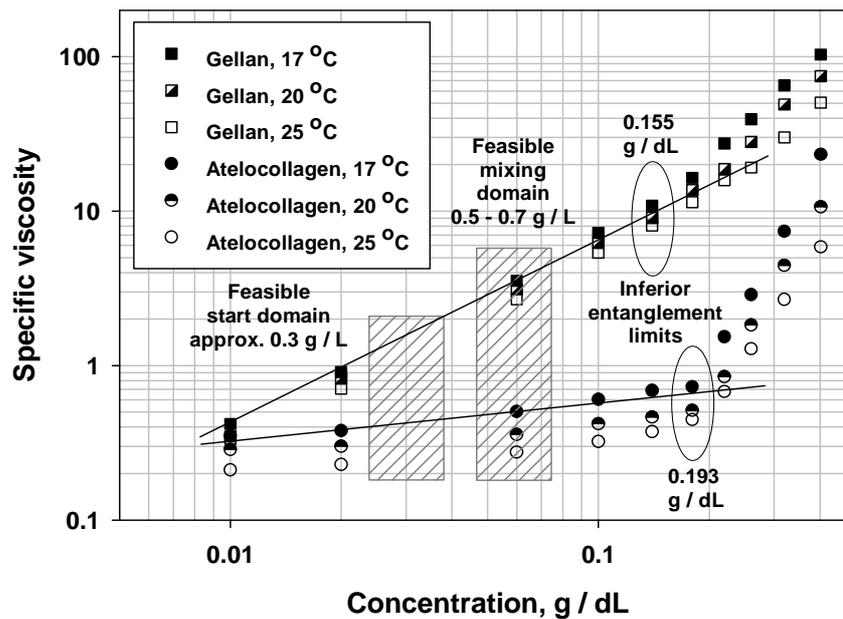


Figure 9. Le domaine de concentration optimal pour le mélange homogène des solutions d'atelocollagène et gellane.

Dans les représentations graphiques on peut observer que l'intervalle de mélange le plus reproductible dans le cas de l'atelocollagène avec l'hyaluronate de sodium est compris entre 0,09–0,15 g/dl, cependant pour l'atelocollagène et le gellane il est de 0,05–0,07 d/dl.

### **IV.3. Diagrammes de phase binaires entre l'atelocollagène et l'hyaluronate ou le gellane**

Les diagrammes de phase sont utiles pour décrire graphiquement "le sort" des mélanges, par la fourniture de la gamme de concentrations des composantes qui génèrent des systèmes stables d'un point de vue de la thermodynamique et physiquement homogènes, ou, par contre, qui présentent des séparations, de phase ou de composition. De plus, ils offrent des informations importantes concernant les compositions spécifiques et le rapport de séparation des composantes d'où résultent les systèmes hétérogènes.

Nous avons effectué trois types d'expériences, différents du point de vue de la manipulation du pH pendant la préparation des mélanges, de la manière suivante:

1. En l'absence d'un régulateur de pH (celui-ci étant imposé par la dissociation de l'atelocollagène, de l'hyaluronate de sodium et du gellane) et l'ajout d'une petite quantité de sel (NaCl) pour fournir des contre-ions;
2. par l'ajustement du pH des solutions à la valeur de l'eau bi-distillée, avant d'être mélangés;
3. par la dissolution de chaque composante du mélange dans une solution tampon à une valeur du pH qui assure un domaine commun de solubilité et avec une faible tendance à l'agrégation (établi antérieurement par turbidimétrie).

Les mélanges d'atelocollagène et d'hyaluronate de sodium ou de gellane ont été réalisés dans des tubes de centrifugation avec un poids total du système de 5 g. Une solution de 10 g/dl NaCl, ou d'eau bi-distillée, ou une solution tampon (en fonction du type d'expriment), est ajoutée dans une somme équivalente à 0,01% w/w, qui fait référence au poids total du système. Après le mélange adéquat, le système obtenu est mûri pendant 18 heures (6 heures à la température ambiante, et 12 heures à 2°C), ensuite soumis à la centrifugation (4000 rotations/min, 30 min, 4°C), tout en récupérant le surnageant. L'atelocollagène et les polysaccharides ont été déterminés quantitativement.

Les quantités des biopolymères naturels ont été évaluées par voie spectrophotométrique, en utilisant le kit Sircol (Biocolor Ltd.), dans le cas de l'atelocollagène; par la méthode au carbazole [140] pour l'hyaluronate de sodium, et en utilisant le kit Blyscan (Biocolor Ltd.) dans le cas du gellane. Dans le cas de l'atelocollagène et du gellane, les longueurs d'onde utilisées ont été de 540 et respectivement de 656 nm. Dans le cas de l'hyaluronate de sodium, puisque la méthode au carbazole nécessite des solutions acides, les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Boeco S22, dans des cuves à usage unique, à la longueur d'onde de 530 nm.

Les règles d'après lesquelles ces mélanges binaires ont été préparés sont présentées dans les équations suivantes:

$$x \text{ Atelocollagène} + y \text{ Polysaccharides} + 0,01 \text{ Sel} = z + 0,01 \text{ Sel} \\ = \text{max. } 0,1 \text{ w/w matière sèche} \quad (1)$$

$$q \text{ Atelocollagène} + p \text{ Polysaccharides} + 0,01 \text{ Sel} = z \text{ w/w matière sèche} \quad (2)$$

$$x \text{ Atelocollagène} + y \text{ Polysaccharides} + 0,01 \text{ Solvant} = z + 0,01 \text{ Solvant} = \\ \text{max. } 0,1 \text{ w/w matière sèche} \quad (1')$$

$$q \text{ Atelocollagène} + p \text{ Polysaccharides} + 0,01 \text{ Solvant} = z \text{ w/w matière sèche} \quad (2')$$

Dans les Figures 10, 11 et 12 les diagrammes de phase obtenus expérimentalement sont présentés. Les positions des points de test utilisés pour tracer des lignes de liaison ont été établies en prenant en considération la courbe binodale. Les lignes de liaison qui définissent les points résultent de l'analyse des phases séparées de mélanges à base des relations (2) et (2'), qui confirment les courbes binodales tracées à base des règles générées par les relations (1) et (1').

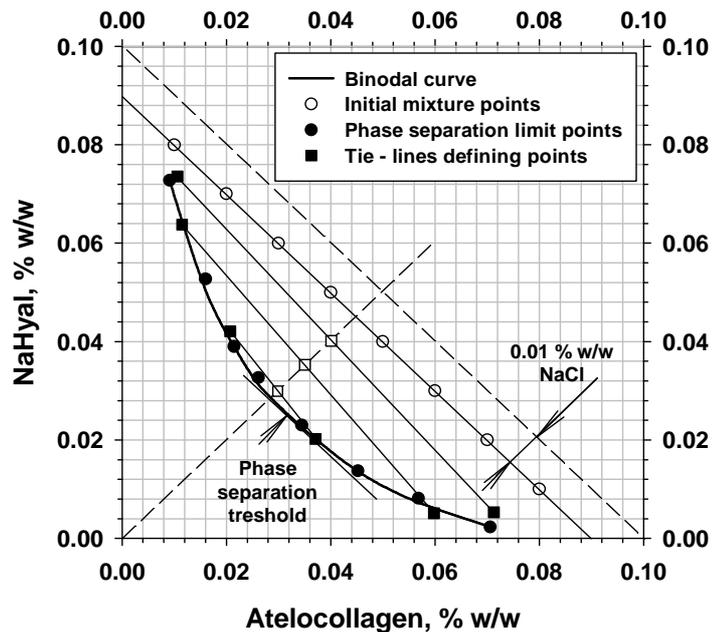


Figure 10. Diagramme de phase du mélange atelocollagène–hyaluronate de sodium, au pH de 3,4, en absence du système tampon.

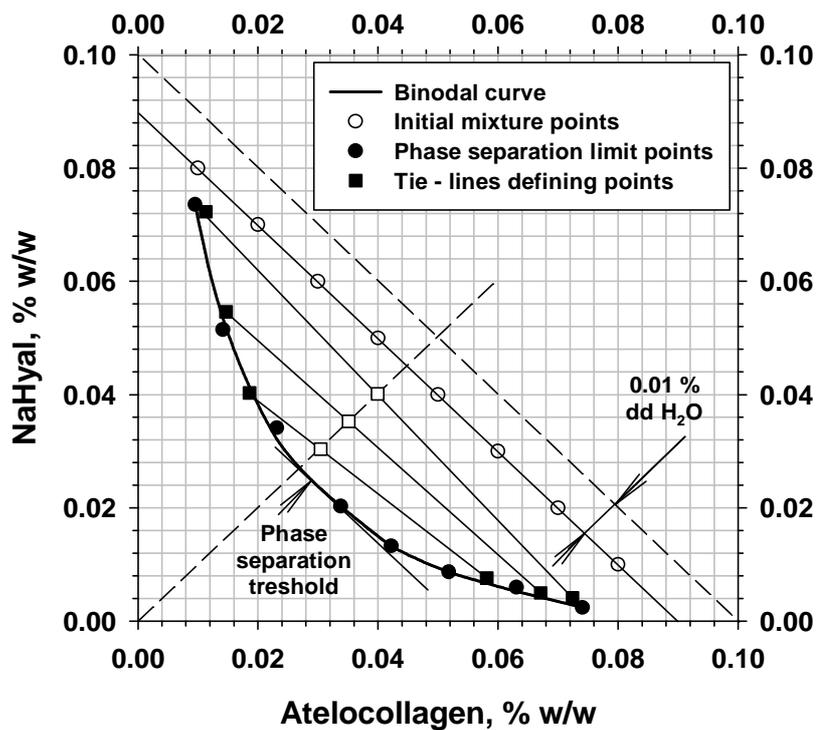


Figure 11. Diagramme de phase du mélange atelocollagène–hyaluronate de sodium, au pH de 5,5, en absence du système tampon, la valeur pH de la solution d'atelocollagène est corrigée avant le mélange.

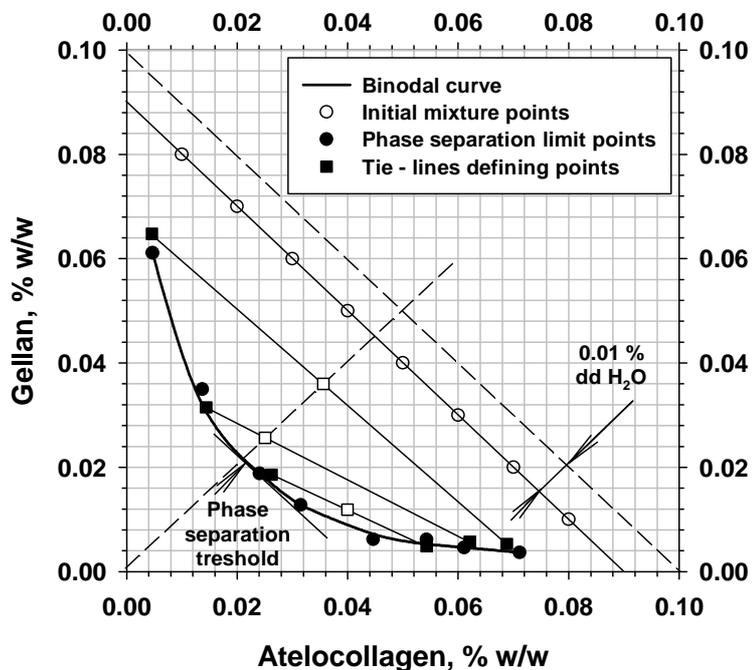


Figure 12. Diagramme de phase du mélange atelocollagène–gellane, à pH de 5,5, en absence du système tampon, la valeur pH de la solution d'atelocollagène est corrigée avant le mélange.

L'asymétrie binodale peut-être corrélée avec les différences entre l'hydrophilie des composants individuels [141]. La distinction de la paire atelocollagène–gellane paraît grande par rapport à la paire atelocollagène–hyaluronate de sodium, le gellane étant le plus réceptif à l'eau. Le maximum de co-solubilité des partenaires des mélanges peut être établi par le placement du seuil de séparation des phases sur le diagramme de phase [142], qui correspond à la concentration totale minimale de partenaires nécessaires pour la séparation des phases. Les coordonnées des points de seuil sur les diagrammes de phase des mélanges investigués ont été: 0,032% w/w atelocollagène / 0,025% w/w hyaluronate de sodium dans la Figure 10, 0,028% w/w atelocollagène / 0,025% w/w hyaluronate de sodium dans la Figure 11, et 0,022% w/w atelocollagène / 0,020% w/w gellane dans la Figure 12.

#### **IV.4. Diagrammes ternaires des mélanges d'atelocollagène, hyaluronate de sodium et gellane**

Tenant compte des difficultés auxquelles nous nous sommes heurtés dans la caractérisation des mélanges binaires, pour les mélanges d'atelocollagène–hyaluronate–gellane, nous avons étudié les diagrammes ternaires de composition habituels des mélanges. Ces diagrammes ont été tracés sur la base de l'équation 3:

$$x \text{ Atelocollagène} + y \text{ Hyaluronate} + z \text{ Gellane} + 0,02 \text{ Solvant} = 0,1 \text{ w/w matière sèche} \quad (3)$$

où la valeur du coefficient  $x$  varie entre 0,00 et 0,06% g/g de substance sèche, et les valeurs des coefficients  $y$  et  $z$  entre 0,01 et 0,07 % g/g de substance sèche.

La méthode expérimentale est identique à celle décrite dans le cas des diagrammes binaires. Nous avons utilisé comme solvant de l'eau bi-distillé ou des solutions tampon, en fonction du type d'expérience.

Dans les Figures 13 et 14 les diagrammes ternaires pour les mélanges atelocollagène-hyaluronate-gellane sont représentés.

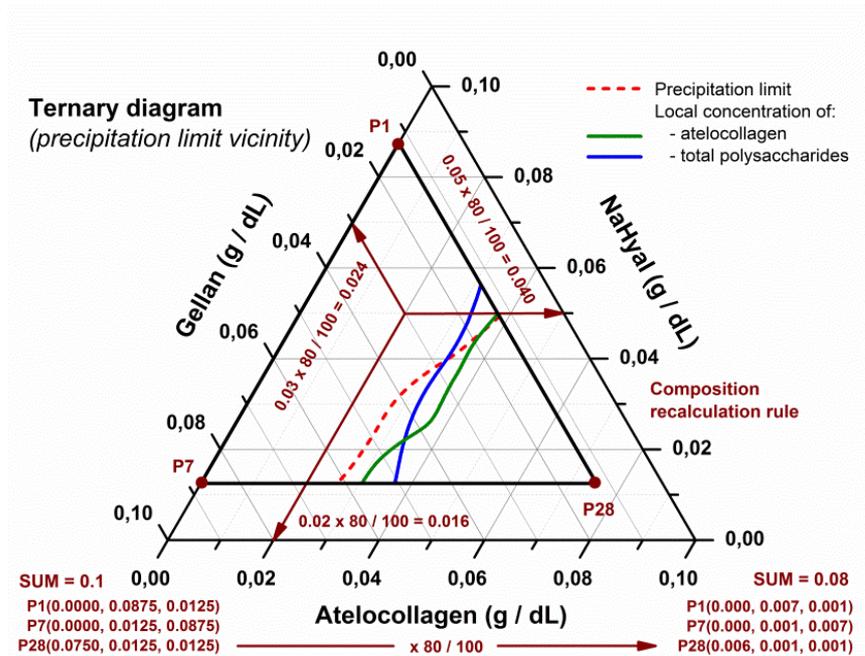


Figure 13. Le diagramme ternaire exprime les conséquences de la séparation des phases dans les mélanges de biopolymère, à pH 5,5, en l'absence du système tampon, au pH de la solution d'atelocollagène corrigé à 5,5 avant le mélange.

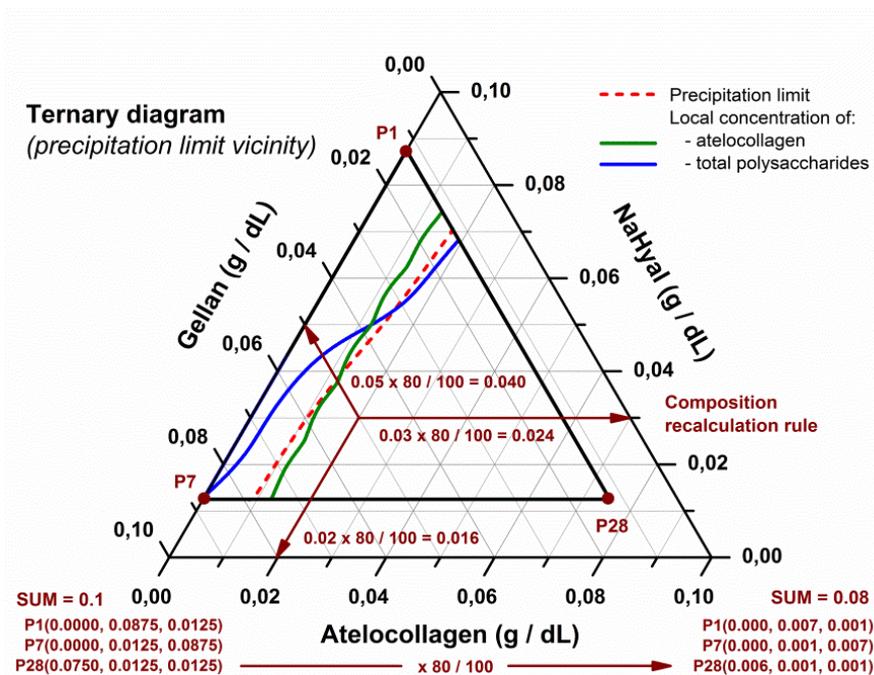


Figure 14. Le diagramme ternaire exprime les conséquences de la séparation des phases dans les mélanges de biopolymère, au pH 9,0, en système tampon TRIS 0,2M.

Ceux-ci ont été obtenus en utilisant l'application software OriginPro 8.6 (OriginLab Co). La limite de co-précipitation exprime la valeur totale des biopolymères naturels pendant la phase dense, mesurée comme des pourcentages g/g. La composition des isolignes a été élaborée par la séparation quantitative de protéine et le contenu total de polysaccharides du surnageant, et par le calcul des sommes correspondantes en co-précipité, comme différence par rapport aux valeurs initiales exprimées comme des pourcentages g/g. Sur les axes des diagrammes ternaires, la quantité des composants a été convertie en g/dl, tenant compte de la densité des solutions standardisées. A cause de quelques limitations dans les représentations des diagrammes ternaires ayant des intervalles avec des variations des composants, en utilisant l'expérience OriginPro 8,6 (tenant compte des valeurs des coefficients x, y et z mentionnés plus haut), un facteur de correction de 0,8 doit être utilisé afin de convertir des valeurs graphiques en celles réelles pour les points qui représentent les quantités sur des diagrammes.

La conclusion prédominante obtenue par la comparaison des deux diagrammes ternaires est le fait que la valeur du pH décide de la quantité d'atolocollagène dans le co-précipité, dans une relation quasi-indépendante du rapport entre les polysaccharides des mélanges (les limites de précipitation sont impliquées d'une manière quasi-parallèle similaire, pourtant la position dans les diagrammes est changée). A une valeur de 5,5, la limite de précipitation est placée à peu près au milieu du diagramme ternaire, indiquant le fait que, au cas où le pH est contrôlé pour être sensiblement acide, une participation uniforme des trois biopolymères naturels pendant la phase de séparation est possible. Par conséquent, si un mélange à fort contenu d'atolocollagène est nécessaire, il est obligatoire de travailler à pH acide; dans le cas contraire, les polysaccharides vont dominer (dans un rapport presque uniforme avec l'augmentation d'atolocollagène). Conformément à la Figure 13, des systèmes ternaires peuvent être obtenues à partir de 0,032 g/dl d'atolocollagène, associé dans les mélanges initiaux, avec, par exemple, 0,040 g/dl d'hyaluronate de sodium, et 0,008 g/dl de gellane, afin d'arriver à une concentration de 0,08 g/dl de substance sèche, comme on peut prévoir par l'équation (3).



## Chapitre V. Hydrogels réticulés de manière covalente avec une composante de collagène et collagène – polysaccharides

Le principe des hydrogels réticulés de manière covalente avec une composante de collagène a été présenté en utilisant la méthode décrite dans le Chapitre III.4.

### V.I. Estimation de la reproductibilité des hydrogels réticulés avec une composante de collagène par caractérisation rhéologique

Le plan de travail utilisé pour déterminer la reproductibilité des hydrogels est présenté dans le Tableau 1. Les quantités d'agent de réticulation et de tensioactif sont calculées pour 5mL de solution de collagène de concentration égale à 6 mg/mL.

Tableau 1. Plan expérimental

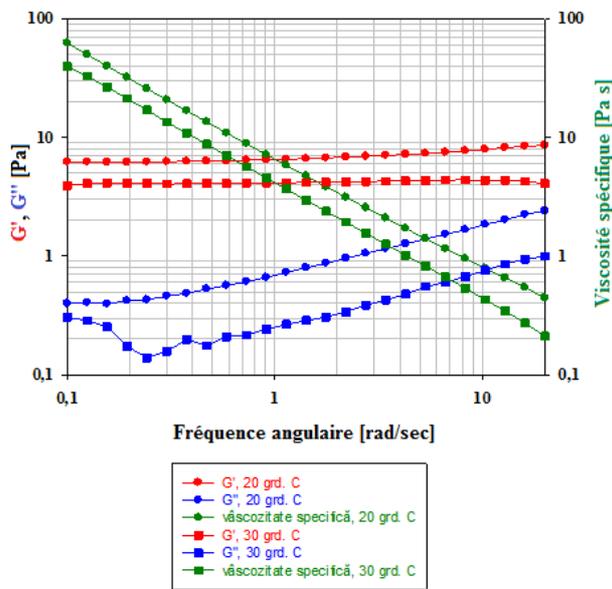
| Nr. échantillon | Rapport $\alpha$ -NH <sub>2</sub> /Réticulant | mg Réticulant | $\mu$ L Tensioactif |
|-----------------|---|---------------|---------------------|
| Gel 1           | 1:50  | 180           | 180                 |
| Gel 2           | 1:100   | 360           | 360                 |

Pour être utilisé avec succès dans diverses applications, les hydrogels doivent présenter un très haut degré de reproductibilité. Pour déterminer la reproductibilité j'ai choisi de réaliser deux séries de gels avec la même composition et des conditions de préparation identiques, et ils ont été soumis à des caractérisations rhéologiques.

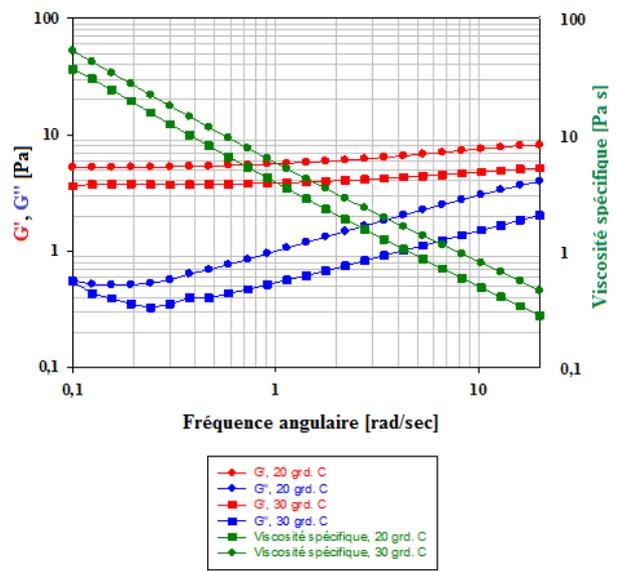
Les mesures rhéologiques sur les hydrogels ont été faites avec le rhéomètre Bohlin Instruments C-VOR. Les mesures ont été effectuées avec un système cône – plan avec les caractéristiques suivantes: angle du cône, 4°, diamètre de la plaque, 40 mm, distance cône – plan, 150  $\mu$ m.

Tous les hydrogels obtenus ont été soumis à un balayage en amplitude à une fréquence constante de 20 rad/s, et des déformations variant entre 0,1% et 25%, pour identifier le domaine de linéarité de la viscoélasticité (LVE). Le balayage de fréquence a été réalisé sur une plage de vitesses angulaires entre 0,1 et 20 rad/sec, l'amplitude étant comprise entre 5 et 10%, en fonction des limites du domaine de linéarité de la viscoélasticité pour chaque échantillon. Les températures de travail étaient 20 et 30°C.

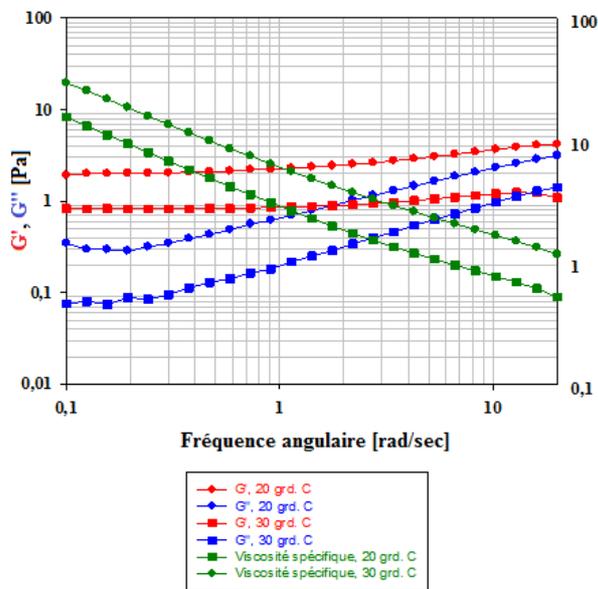
Dans la Figure 15 (a, a', b et b') l'évolution des paramètres rhéologiques est présentée sur deux séries de hydrogels réticulés conformément au Tableau 1.



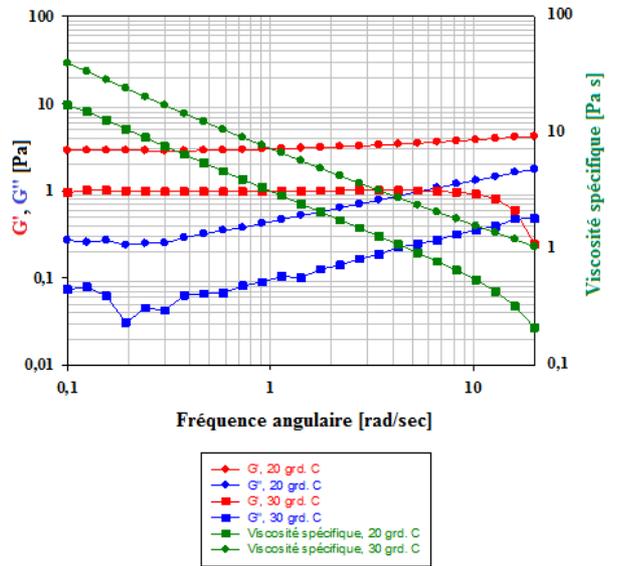
a – gel 1



a' – gel 1



b – gel 2



b' – gel 2

Figure 15. Reproductibilité des hydrogels réticulés avec une composante de collagène (mise en évidence par rhéologie).

Le fait que les valeurs des modules de viscosité et de perte sont à peu près égales suggère une bonne reproductibilité de la méthode de réalisation des hydrogels réticulés avec une composante de collagène. En analysant les données obtenues à partir du test de balayage en fréquence, tous les hydrogels étudiés sont fortement dépendants de la fréquence. Le comportement des quatre échantillons étudiés est principalement élastique ( $G' > G''$ ) à travers le domaine de fréquence étudié.

Pour tous les échantillons analysés rhéologiquement, des structures de gel stable ont été trouvées. Les valeurs numériques du module de stockage  $G'$  et les différences avec celles du module de perte  $G''$  indiquent que les hydrogels obtenus peuvent être considérés comme des réseaux réticulés stables, avec une élasticité élevée.

## V.2. Étude par rhéologie des hydrogels à base de collagène et collagène – polysaccharides

Les hydrogels à base de collagène et collagène – polysaccharides réticulés de manière covalente ont été obtenus en utilisant la méthode décrite dans le Chapitre III.4.

Le plan de travail utilisé pour obtenir des hydrogels est présenté dans le Tableau 2. Les quantités de réticulant et tensioactif sont calculées pour 5mL de solution de collagène avec une concentration de 6 mg/mL.

Comme pour l'étude de reproductibilité, les hydrogels ont été soumis à un balayage en amplitude avec une fréquence constante de 20 rad/s, et des déformations variant de 0,1% à 25%, pour identifier le domaine de linéarité de la viscoélasticité (LVE). Les balayages en fréquence ont été réalisés sur une plage de vitesse angulaire comprise entre 0,1 et 20 rad/sec, l'amplitude entre 5 et 10%, en fonction des limites du domaine de linéarité de la viscoélasticité de chaque échantillon. Les températures de travail étaient 20, 30 et 37°C.

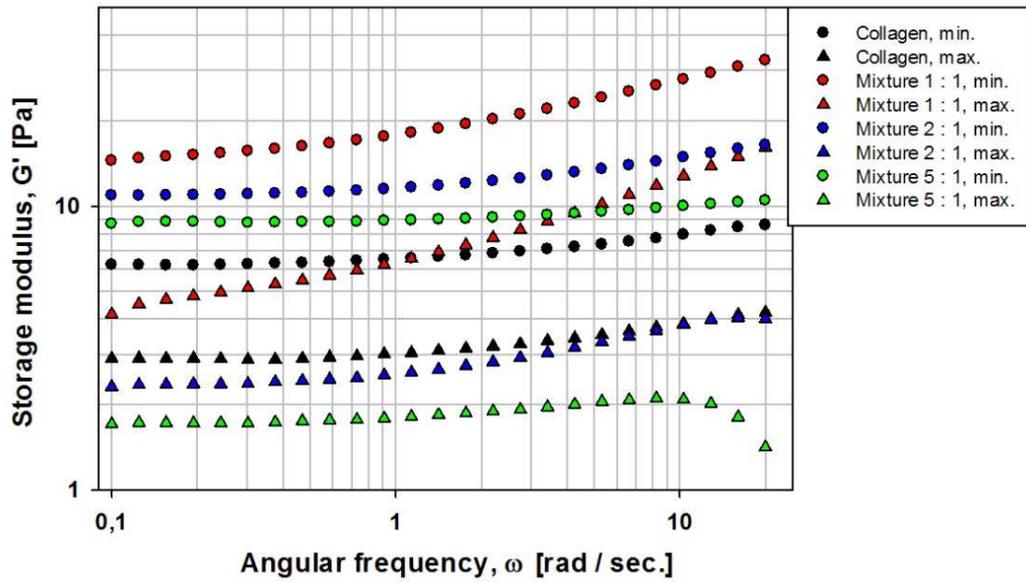
Les caractéristiques viscoélastiques des matériaux peuvent être efficacement évaluées en utilisant des tests oscillatoires. Les caractéristiques rhéologiques suivantes ont été déterminées:

- a. le module de stockage ( $G'$ ), qui est une mesure de l'énergie accumulée par l'échantillon pendant le processus de cisaillement (cette énergie est disponible); par conséquent,  $G'$  caractérise le comportement élastique du matériau analysé;
- b. le module de perte ( $G''$ ), qui est une mesure de l'énergie de déformation dissipée dans l'échantillon pendant le processus de cisaillement (cette énergie complètement perdue); par conséquent,  $G''$  caractérise le comportement visqueux du matériau;
- c. le facteur de perte,  $\tan(\delta) = G''/G'$ , qui caractérise la relation des contributions élastique et visqueuse au comportement global de l'échantillon analysé; en général, pour l'état liquide,  $\tan(\delta) > 1$  ( $G'' > G'$ ), pour l'état de gel (solide),  $\tan(\delta) < 1$  ( $G' > G''$ ), et pour le point de transition (gélifiant),  $\tan(\delta) = 1$  ( $G'' = G'$ );
- d. la viscosité complexe,  $\eta^*$ .

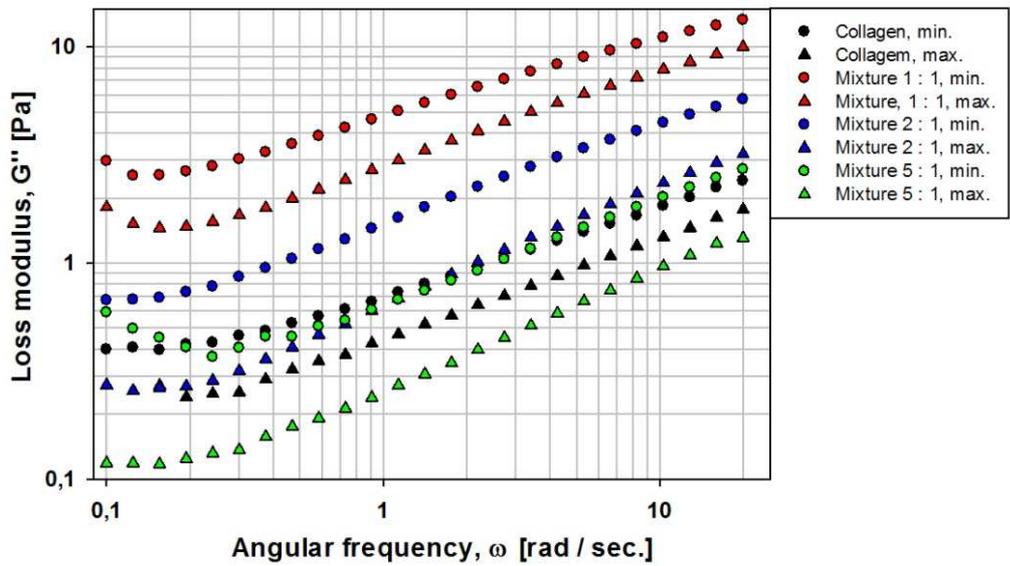
Tableau 2. Plan expérimental

|              | <b>Collagène</b>                        | <b>1:1 Coll:NaHyal</b>                                     | <b>2:1 Coll:NaHyal</b>                                     | <b>5:1 Coll:NaHyal</b>                                    |
|--------------|---|--|--|---|
| <b>Gel 1</b> | 180 mg Tensioactif<br>180 µL Réticulant | 30 mg SU NaHyal<br>270 mg Tensioactif<br>270 µL Réticulant | 15 mg SU NaHyal<br>225 mg Tensioactif<br>225 µL Réticulant | 6 mg SU NaHyal<br>198 mg Tensioactif<br>198 µL Réticulant |
| <b>Gel 2</b> | 270 mg Tensioactif<br>270 µL Réticulant | 30 mg SU NaHyal<br>360 mg Tensioactif<br>360 µL Réticulant | 15 mg SU NaHyal<br>315 mg Tensioactif<br>315 µL Réticulant | 6mg SU NaHyal<br>288 mg Tensioactif<br>288 µL Réticulant  |
| <b>Gel 3</b> | 360 mg Tensioactif<br>360 µL Réticulant | 30 mg SU NaHyal<br>450 mg Tensioactif<br>450 µL Réticulant | 15 mg SU NaHyal<br>405 mg Tensioactif<br>405 µL Réticulant | 6 mg SU NaHyal<br>378 mg Tensioactif<br>378 µL Réticulant |
| <b>Gel 4</b> | 450 mg Tensioactif<br>450 µL Réticulant | 30 mg SU NaHyal<br>540 mg Tensioactif<br>540 µL Réticulant | 15 mg SU NaHyal<br>495 mg Tensioactif<br>495 µL Réticulant | 6 mg SU NaHyal<br>468 mg Tensioactif<br>468 µL Réticulant |
| <b>Gel 5</b> | 540 mg Tensioactif<br>540 µL Réticulant | 30 mg SU NaHyal<br>630 mg Tensioactif<br>630 µL Réticulant | 15 mg SU NaHyal<br>585 mg Tensioactif<br>585 µL Réticulant | 6 mg SU NaHyal<br>558 mg Tensioactif<br>558 µL Réticulant |

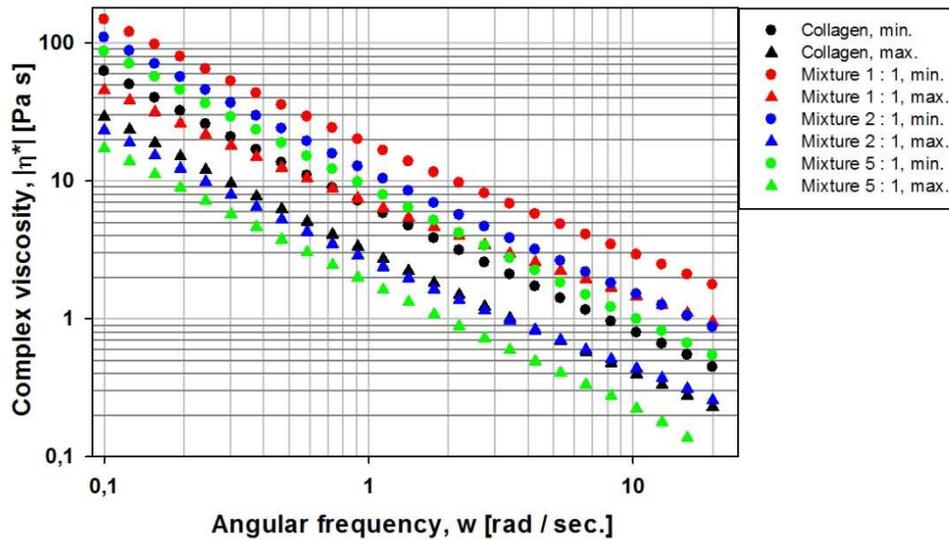
Dans les Figures 16 a, b et c les modules  $G'$  et  $G''$ , et la viscosité relative sont présentés en régime oscillatoire, en fonction de la fréquence, à 20°C, pour les mélanges préparés selon le Tableau 2.



(a) - Module de stockage ou module élastique  $G'$



(b) – Module de perte ou module visqueux  $G''$

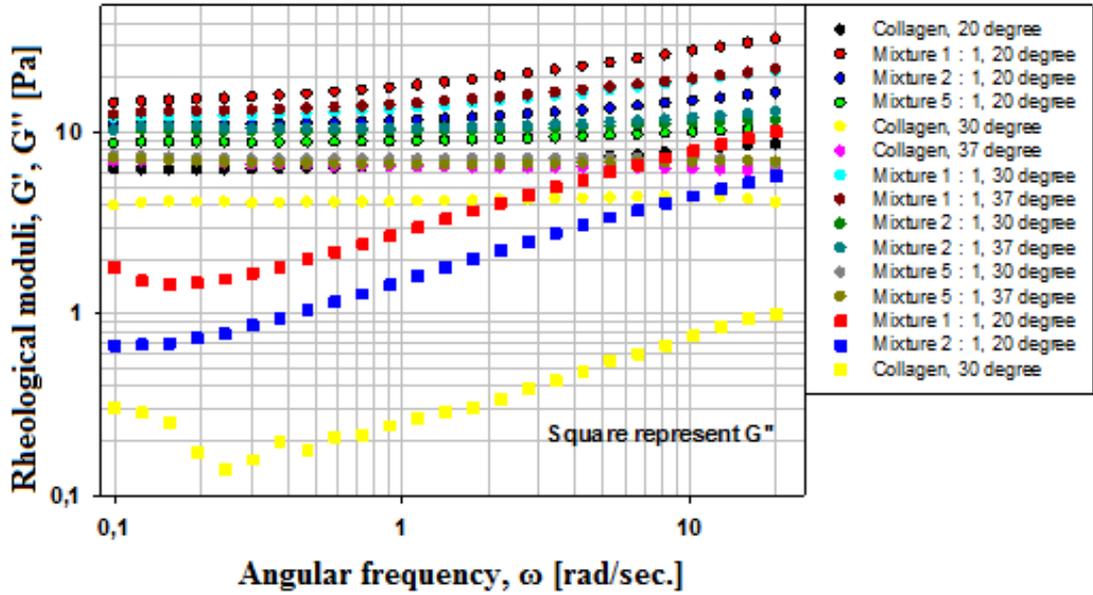


(c) – Viscosité complexe

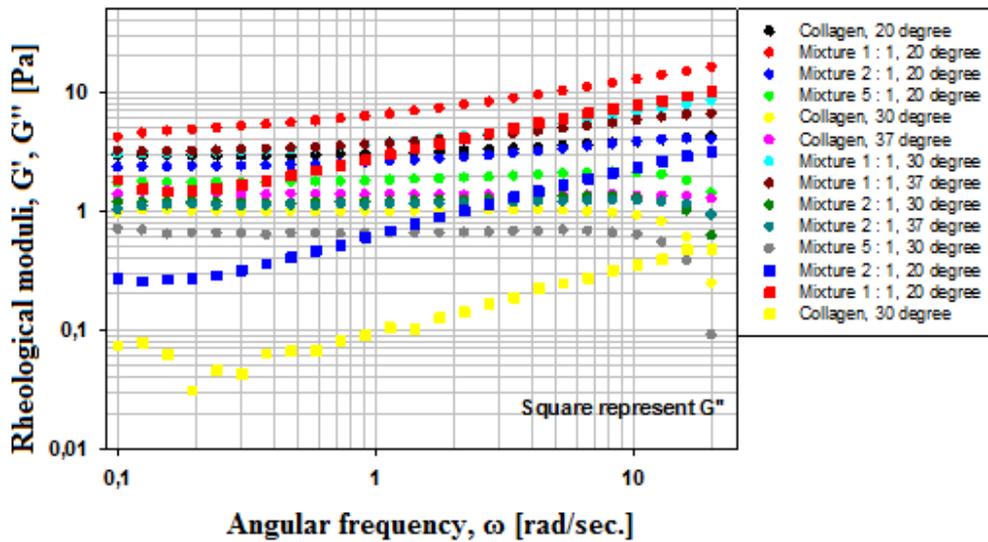
Figure 16. Caractéristiques rhéologiques des hydrogels, déterminées à 20°C.

Les Figures 16 a et b indiquent que dans toute la plage de fréquence balayée, le module de stockage possède des valeurs plus élevées que le module de perte, confirmant le comportement rhéologique de gel pour toutes les compositions étudiées. Pour tous les mélanges binaires, les valeurs de modules  $G'$  et  $G''$  sont supérieures à celles des hydrogels à base de collagène. Ceci est probablement dû à la formation de ponts de réticulation supplémentaires, avec la participation de groupes réactifs du hyaluronane. Une caractéristique remarquable est que les paramètres rhéologiques ont des valeurs décroissantes avec un degré croissant de réticulation pour tous les rapports de mélange entre l'atlocollagène et le hyaluronane. En outre, les paramètres rhéologiques diminuent lorsque la fraction de polysaccharide dans le mélange augmente.

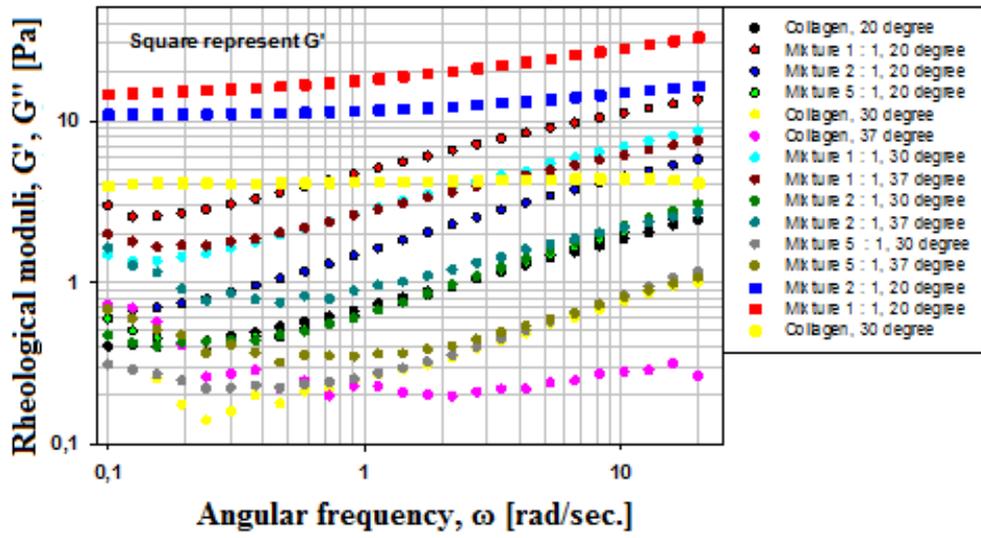
La Figure 17 (a, b, et c) présente l'influence de la température sur les caractéristiques rhéologiques des hydrogels binaires étudiés, dans le cas de la réticulation avec les quantités minimales (a et c) et maximales (b et d) de mélange réticulé. Les valeurs des modules élastiques et de perte diminuent avec l'augmentation de la température, probablement en raison du changement de conformation de la macromolécule d'atlocollagène.



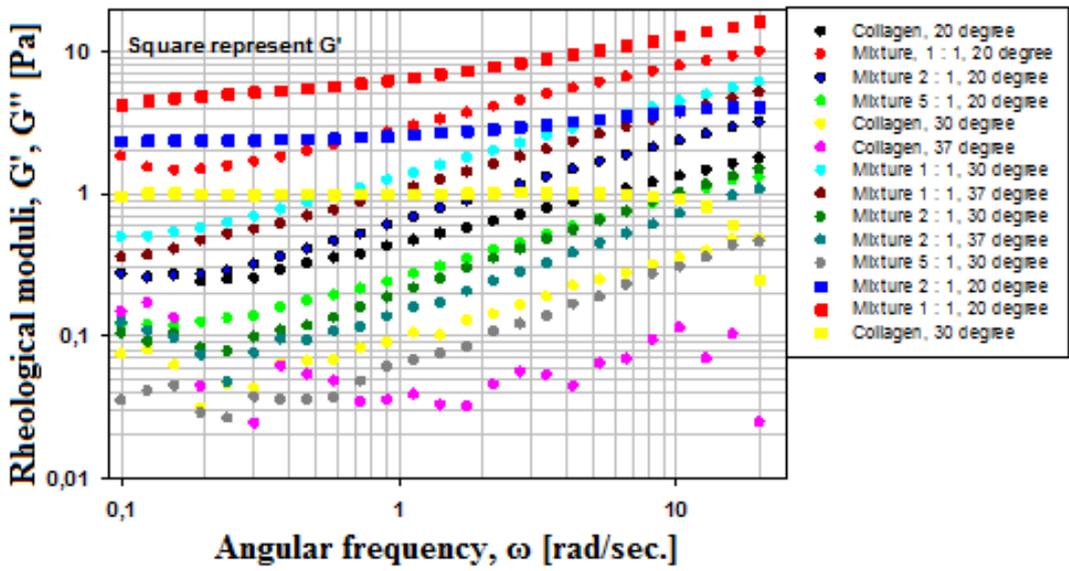
(a) – Dépendance en température des modules de stockage pour des hydrogels faiblement réticulés.



(b) – Dépendance en température des modules de stockage pour des hydrogels fortement réticulés.



(c) - la dépendance en température du module de perte pour les hydrogels faiblement réticulés.



(d) - la dépendance en température du module de perte pour les hydrogels fortement réticulés.

Figure 17. Dépendance de caractéristiques rhéologiques des hydrogels, en fonction du degré de réticulation et de la température à laquelle leur détermination rhéologique est réalisée.

### V.3. Analyse thermique

L'analyse thermogravimétrique (TGA) permet la détermination de la perte de masse en fonction de la température. Les thermogrammes ont été réalisés en utilisant l'analyseur TA Instrument Q50, à flux d'air (100 ml/min) avec une rampe de chauffage de 10°C/min jusqu'à la température de 120°C, suivie par le maintien à température constante (120°C) pendant une

heure. Les mesures ont été effectuées directement sur des gels humides, non soumis à lyophilisation.

Les courbes thermogravimétriques différentielles comparatives des hydrogels à base de collagène et les hydrogels binaires, collagène-hyaluronane, sont présentées dans les Figures 18 et 19.

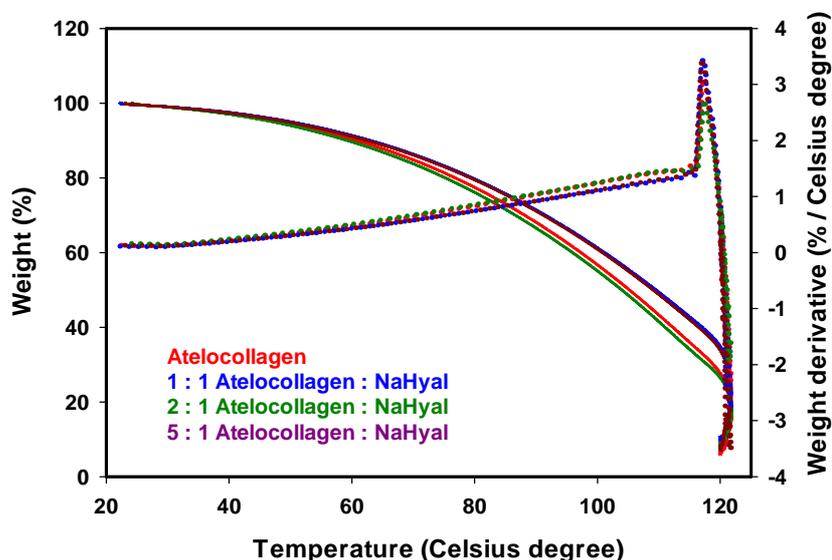


Figure 18. Courbes thermogravimétriques et leurs dérivées pour des hydrogels faiblement réticulés.

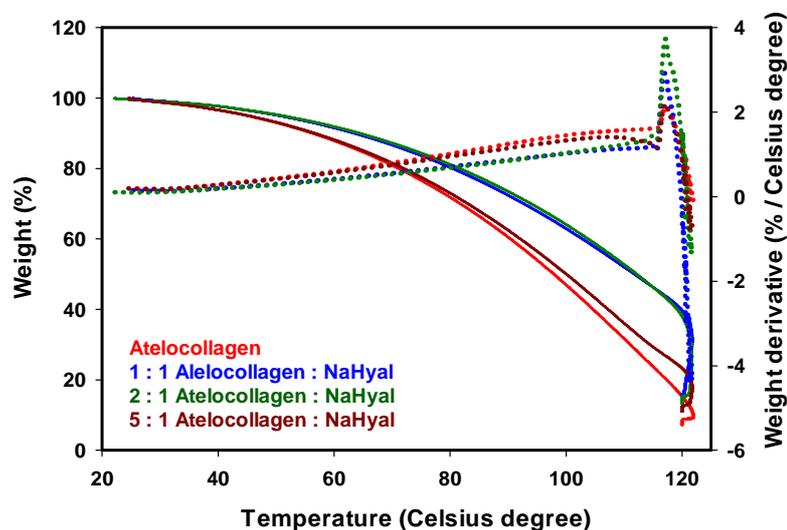


Figure 19. Courbes thermogravimétriques et leurs dérivées pour des hydrogels hautement réticulés.

L'analyse thermogravimétrique révèle que les hydrogels binaires sont thermiquement plus stables par rapport aux hydrogels à base de collagène. La perte de poids dans l'étape de

maintien à 120°C est approximativement de 90% de la masse initiale de l'échantillon, en raison de la grande quantité d'eau retenue physiquement dans le réseau des hydrogels.

Les transitions de phase ont été étudiées par calorimétrie différentielle à balayage en utilisant un équipement TA Instruments Q100, dans le flux d'azote (50 ml/min). Les échantillons (de masse approximative 10 mg) ont été placés dans des creusets d'aluminium hermétiquement fermés et chauffés à 120°C, avec une rampe de 10°C/min. Les résultats traités avec l'application software Universal Analysis (TA Instrument, v 4.4a) sont présentés dans les Figures 20 et 21.

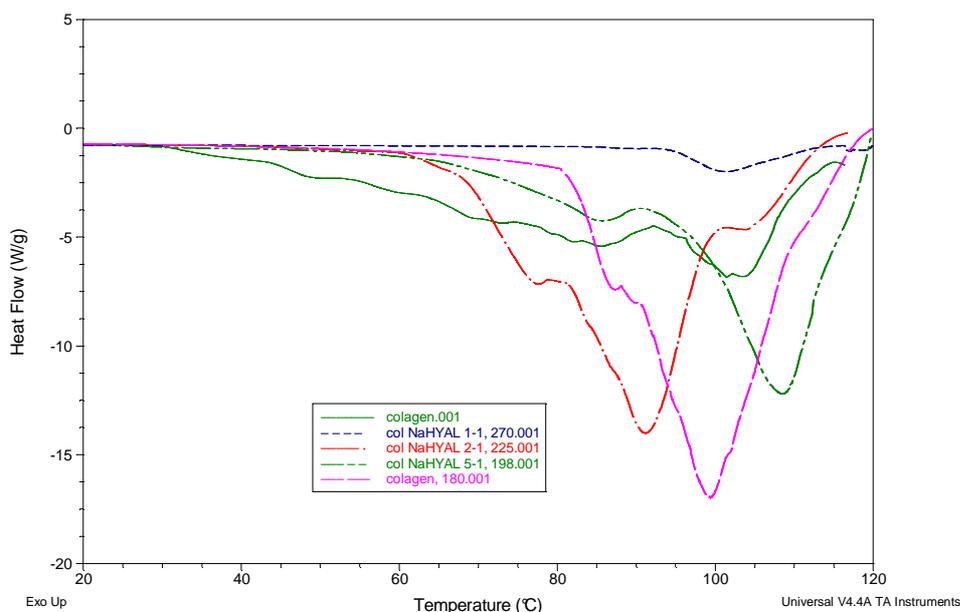


Figure 20. Courbes DSC pour les hydrogels faiblement réticulés.

Il est évident que la température affecte de manière significative la structure des hydrogels, et l'augmentation de la quantité d'agent de réticulation conduit à une diminution de la température de dénaturation du collagène, à l'exception de l'hydrogel de rapport de mélange égal à 5:1. La perte de masse de collagène devient significative à des températures supérieures à 30°C. En comparaison, les hydrogels binaires sont thermiquement plus stables que les hydrogels à base de collagène réticulés par des liaisons covalentes.

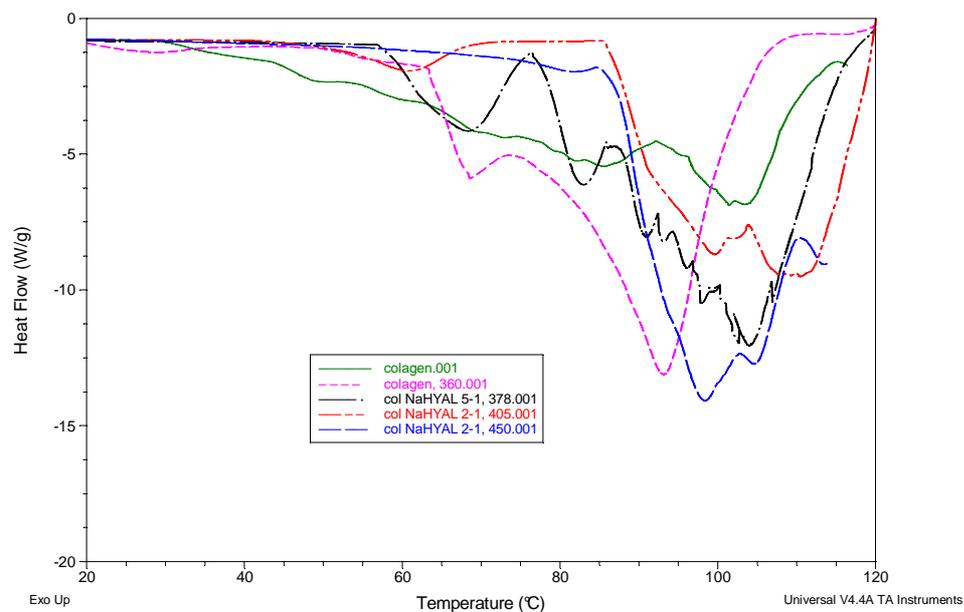
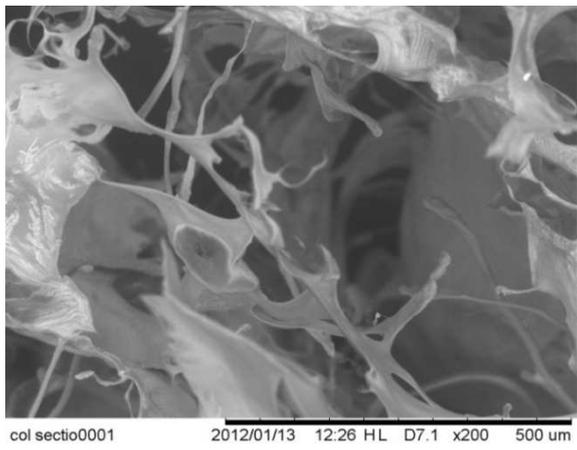


Figure 21. Courbes DSC pour les hydrogels hautement réticulés.

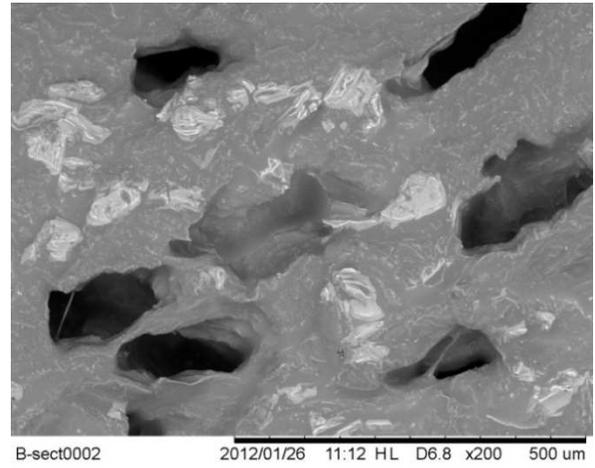
#### V.4. Caractérisation morphologique par microscopie électronique à balayage

Les caractéristiques morphologiques des matériaux obtenus, tels que la porosité et la texture, ont été examinées et les images obtenues sont présentées dans la Figure 22. L'image de microscopie électronique à balayage (MEB) permet la caractérisation morphologique des hydrogels obtenus. Pour l'observation microscopique (Figure 8), les hydrogels ont été lyophilisés et sectionnés dans la même position pour assurer la reproductibilité des échantillons.

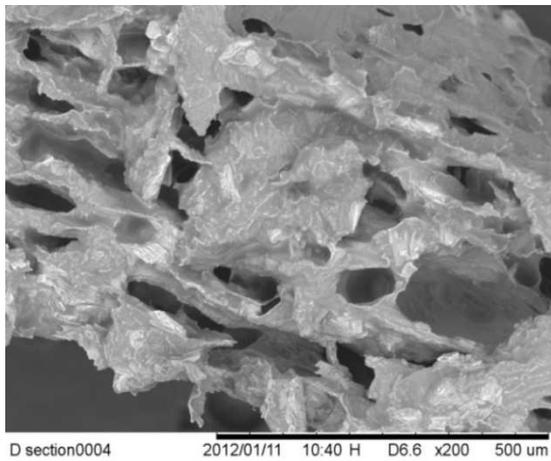
La microscopie électronique à balayage révèle des différences significatives entre le collagène lyophilisé (a), des hydrogels à base de collagène réticulé (b) et les mélanges réticulés contenant du collagène et du hyaluronane (c, d, e). Ces derniers présentent une structure poreuse plus uniforme avec des pores interconnectés. Pour les hydrogels fortement réticulés et dans des hydrogels avec les fractions en masse de hyaluronane plus forte, la dimension des pores est plus petite, probablement en raison de compaction. La taille idéale des pores d'une matrice utilisée en ingénierie tissulaire est entre 100 et 200  $\mu\text{m}$  [143], ces dimensions facilitant la prolifération cellulaire dans les espaces interstitiels. Compte tenu de cela, on considère que les hydrogels obtenus sont recommandés pour une utilisation dans l'ingénierie tissulaire.



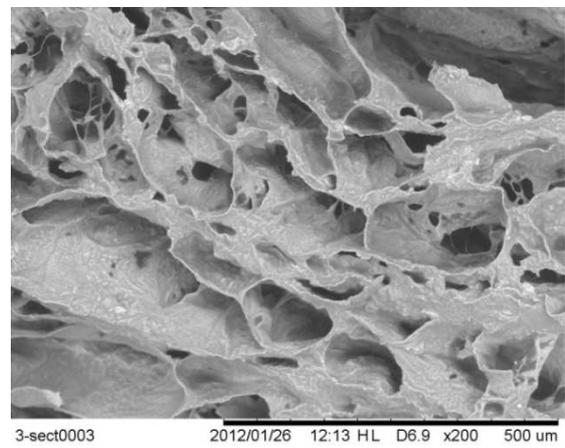
(a) – collagène lyophilisé



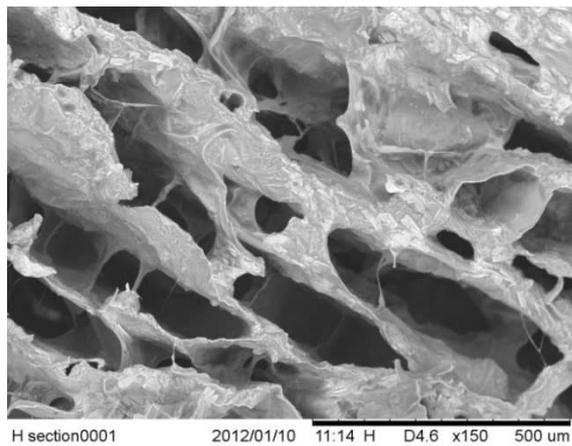
(b) – collagène réticulé



(c) – cryogels 1:1 collagène : hyaluronane



(d) – cryogels 2:1 collagène : hyaluronane



(e) – cryogels 5:1 collagène : hyaluronane

Figure 22. Morphologie des cryogels obtenus à partir des hydrogels étudiés.

## V.5. Degré maximal de gonflement

L'étude de la capacité de gonflement des hydrogels en milieu aqueux a été réalisée par thermogravimétrie, comme cela a été indiqué dans le chapitre III.4.1. Pour ces déterminations des hydrogels à base de collagène réticulés par des liaisons avec différents degrés de réticulation ont été utilisés.

Les hydrogels pesés précédemment ont été immergés dans une solution tampon phosphate pH = 7,4 (PBS) et les mesures ont été effectuées à des intervalles du temps bien établis. L'étude de la cinétique de gonflement des hydrogels est représentée dans la Figure 23. De la représentation graphique nous pouvons voir que les hydrogels gonflent beaucoup dans les premières minutes en raison de leur structure morphologique, suivie d'une augmentation lente durant environ 3-4 heures, puis un équilibre s'instaure. On peut voir que les hydrogels avec un degré inférieur de réticulation gonflent plus que ceux qui ont un plus fort degré de réticulation.

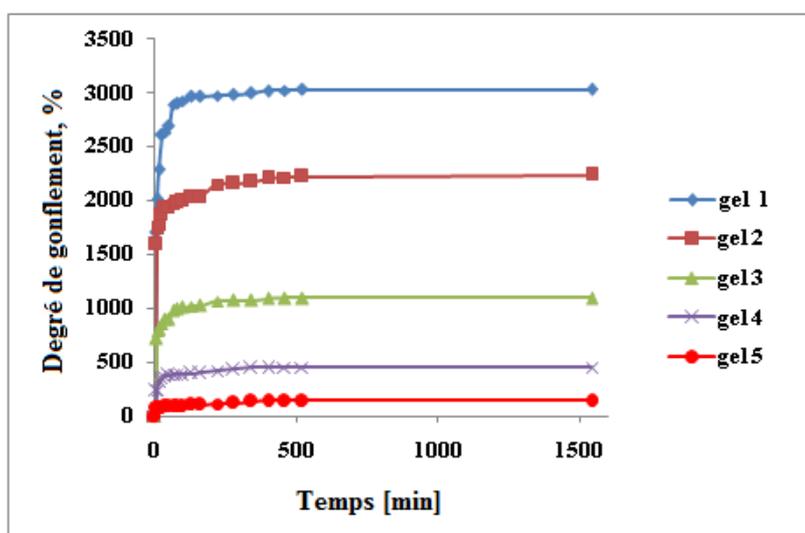


Figure 23. Courbes cinétiques de gonflement des hydrogels à base de collagène dans une solution de PBS (pH = 7,4).

Le degré de gonflement maximal des hydrogels se trouve dans la gamme 150 – 3050% en notant qu'il est fortement influencé par le degré de réticulation.

Dans les mêmes conditions de travail, les études de gonflement des hydrogels à base de collagène et hyaluronane réticulés par des liaisons covalentes ont été réalisées (Figure 24).

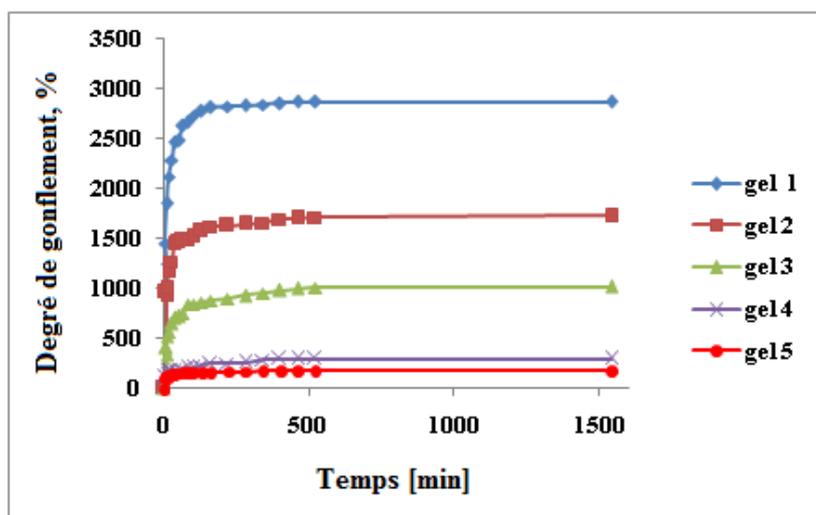


Figure 24. Courbes cinétiques de gonflement des hydrogels à base de collagène et hyaluronane dans une solution de PBS (pH = 7,4).

La représentation graphique indique que le degré maximal de gonflement des hydrogels diminue avec l'augmentation du degré de réticulation, et il est compris entre 185 et 2880%.

Contrairement aux hydrogels à base de collagène, les hydrogels binaires présentent un degré de gonflement un peu plus faible par introduction du polysaccharide dans le système.

### V.6. Capacité d'inclusion des hydrogels avec la Levofloxacin

Pour effectuer ces études le même ensemble d'échantillons que pour l'étude de gonflement a été utilisé. Le mode de travail a été présenté dans le chapitre III.4.2.

Pour ces études la Levofloxacin (sel de sodium) a été choisie comme médicament. L'échantillon pesé a été immergé dans 10 ml d'une solution de Levofloxacin dans un tampon acétate (50 mg/ml) et laissé pendant 12 heures pour achever le processus de diffusion, en agitant modérément. Les deux études, de chargement (ou d'inclusion) et de libération nécessitent une courbe d'étalonnage (Figure 25).

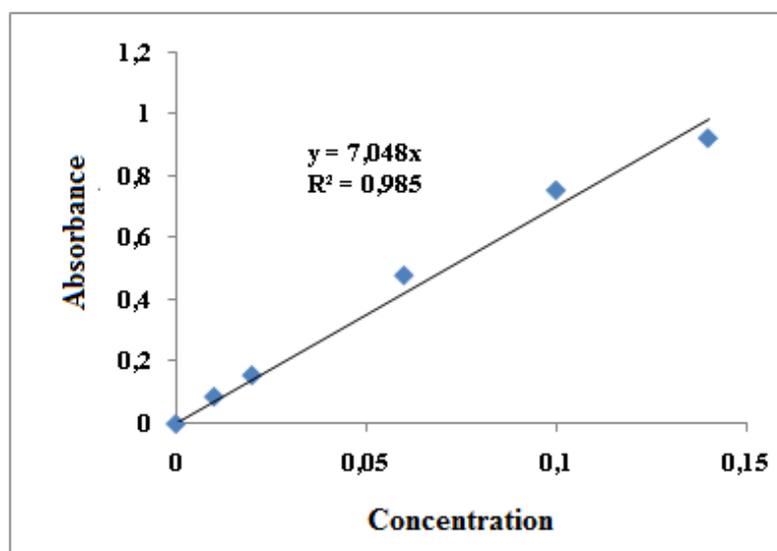


Figure 25. Courbe d'étalonnage de Levofloxacin dans un tampon acétate.

Tableau 3. Résultats de chargement des hydrogels.

| Nr.   |                                    | LVF/hydrogels, g/g |
|-------|------------------------------------|--------------------|
| Gel 1 | à base de collagène                | 3,06               |
| Gel 2 |                                    | 1,84               |
| Gel 3 |                                    | 1,50               |
| Gel 4 |                                    | 0,63               |
| Gel 1 | à base de collagène et hyaluronane | 3,60               |
| Gel 2 |                                    | 3,36               |
| Gel 3 |                                    | 2,52               |
| Gel 4 |                                    | 0,69               |

La quantité de LVF incluse dans les hydrogels à base de collagène diminue avec l'augmentation du degré de réticulation, et elle est en corrélation avec le degré de gonflement. Du Tableau 3 on peut voir que les hydrogels présentent une grande capacité de chargement du médicament (le rapport des masses médicament/hydrogel est supérieur à 1, à l'exception de l'échantillon 4). Le même phénomène est observé dans les hydrogels à base de collagène et hyaluronane.

## **V.7. Etudes de biocompatibilité des hydrogels**

Pour utiliser un hydrogel avec succès dans le domaine biomédical, celui-ci ne doit pas induire une réaction indésirable dans l'organisme.

La cytotoxicité et la prolifération cellulaire sont les plus importantes études pour évaluer la biocompatibilité d'un matériau.

### **V.7.1. Caractérisation de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire des hydrogels**

Le premier test effectué était la cytotoxicité (la viabilité cellulaire) des hydrogels. Pour ces études trois types d'hydrogels ont été utilisés: un à base de collagène réticulé et 2 à base de collagène et hyaluronane de sodium dans le rapport de 1:1 et 5:1, respectivement.

Initialement, les échantillons ont été stérilisés avec de l'éthanol 70% pendant 15 min, puis lavés 4-5 fois dans la solution HBSS stérile (Solution saline équilibrée de Hank's - Sigma-Aldrich). Les matériaux ainsi préparés ont été laissés à gonfler durant au moins 48 heures pour obtenir un hydrogel uniforme dans des conditions suivantes: 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et humidité relative de 95%.

Pour le test de la cytotoxicité des hydrogels la lignée 3T3 de fibroblastes de souris ont été utilisées et elle a été mise en contact direct avec les hydrogels. La viabilité cellulaire par technique Alamar bleu a été déterminée à 24 et 48 heures d'incubation des cellules avec les matériaux.

Après incubation, la fluorescence émise par la solution a été lue au moyen d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et d'émission égale à 590 nm. Le témoin utilisé est un volume égal de HBSS, et en tant que contrôle négatif - seulement un réactif A-bleu 10%. Les valeurs de fluorescence des échantillons expérimentaux ont été comparées au témoin (appelé "contrôle") et exprimée en % viabilité, où la viabilité du témoin a été considérée comme égale à 100% (Figure 26).

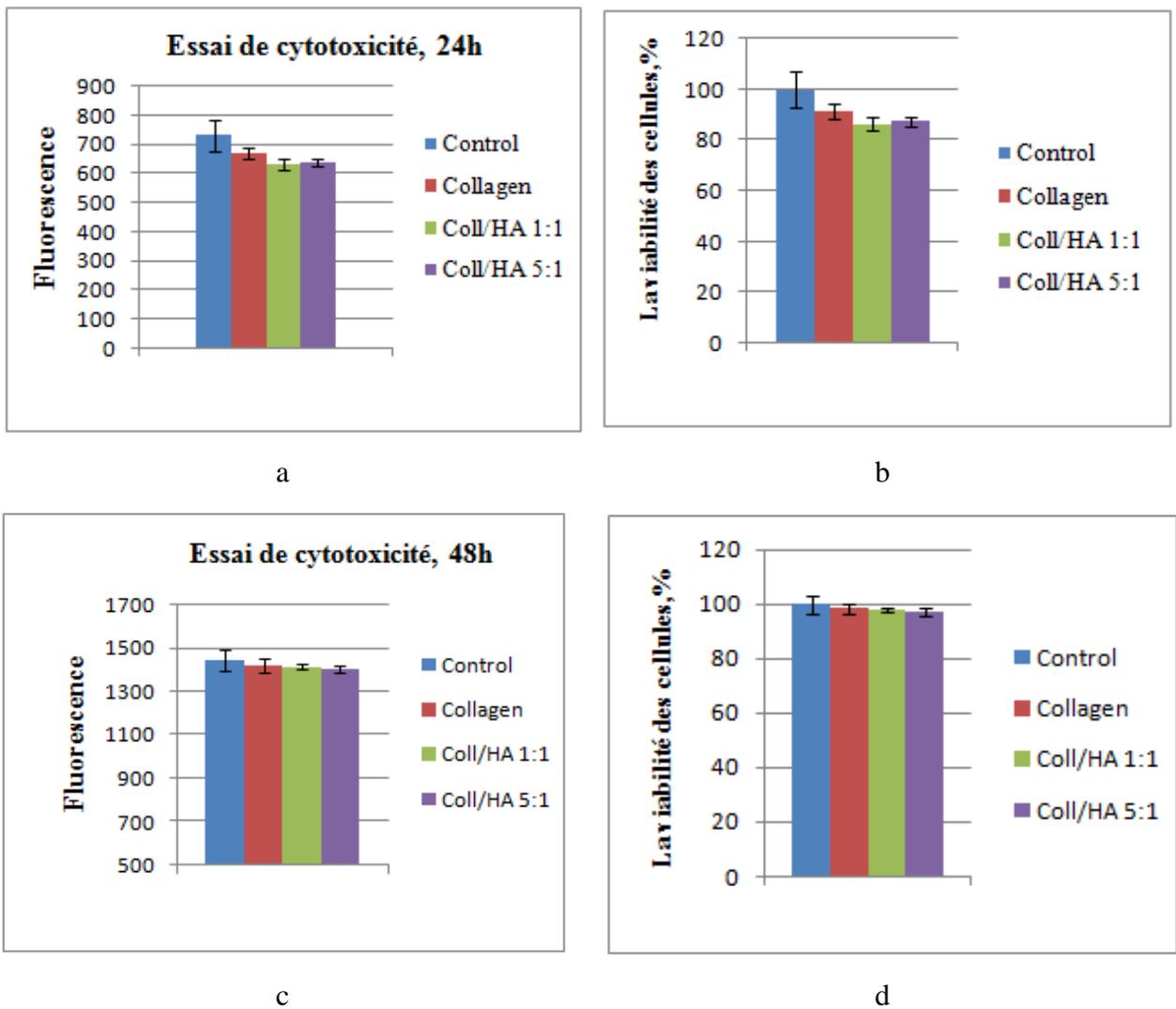


Figure 26. Cytotoxicité et viabilité cellulaire des hydrogels à 24 (a et c) et 48 (b et d) heures.

La Figure 26 a montre que, à 24 et 48 heures d'incubation, les hydrogels sont pratiquement non-toxiques (les valeurs sont à peu près égales à celles du témoin). À 24 heures, il apparaît que, la viabilité est de 91% pour l'hydrogel à base de collagène et 86 et 87% pour les hydrogels avec le hyaluronane. À 48 heures, la viabilité augmente pour être à peu près égale à celle du témoin, de 98% pour l'hydrogel à base de collagène et 97% pour les hydrogels avec le hyaluronane.

Après essai de cytotoxicité et de viabilité cellulaire, il est constaté que les hydrogels à base de collagène et collagène – hyaluronane sont non-toxiques, et que la viabilité des cellules est presque de 100%.

### V.7.2. Etudes de la prolifération cellulaire des hydrogels

Une autre méthode pour déterminer la biocompatibilité est la méthode de la prolifération cellulaire. Ceci est fait en utilisant le réactif PicoGreen (Quant-iT™ Réactif PicoGreen® dsADN et Kits, Invitrogen) pour la détermination quantitative de l'ADN bi caténaire dans la solution.

La fluorescence émise par la solution à été lue par voie spectrophotométrique à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 520 nm, en utilisant le Varioskan FLASH (Thermo Scientific) (Figure 27).

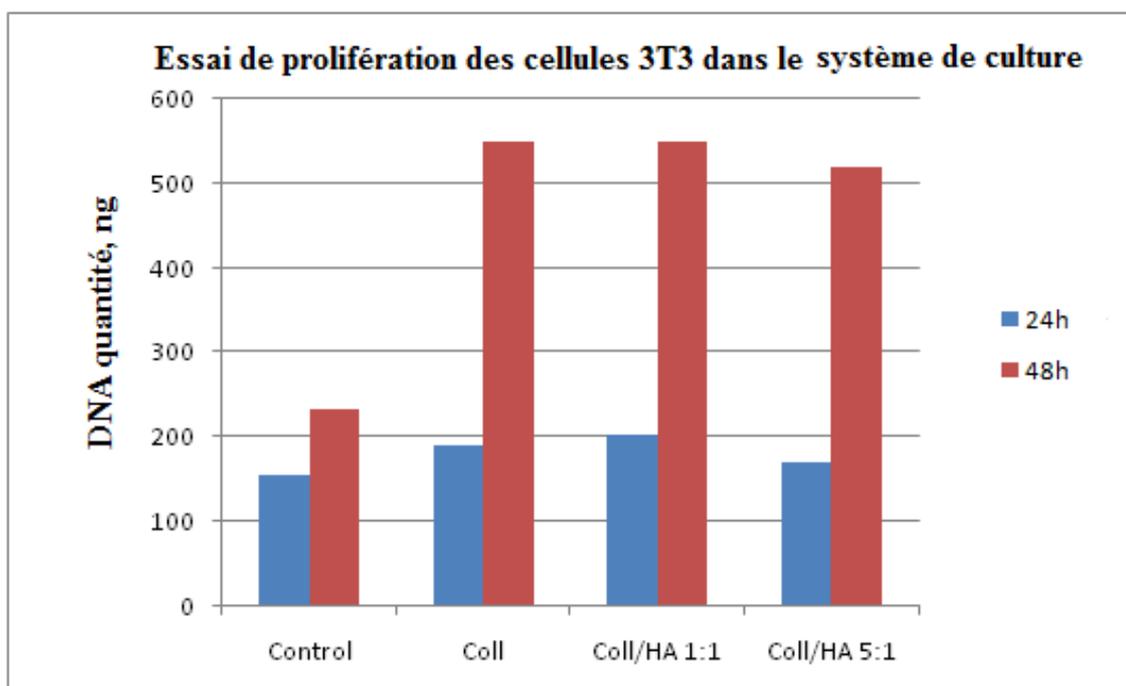


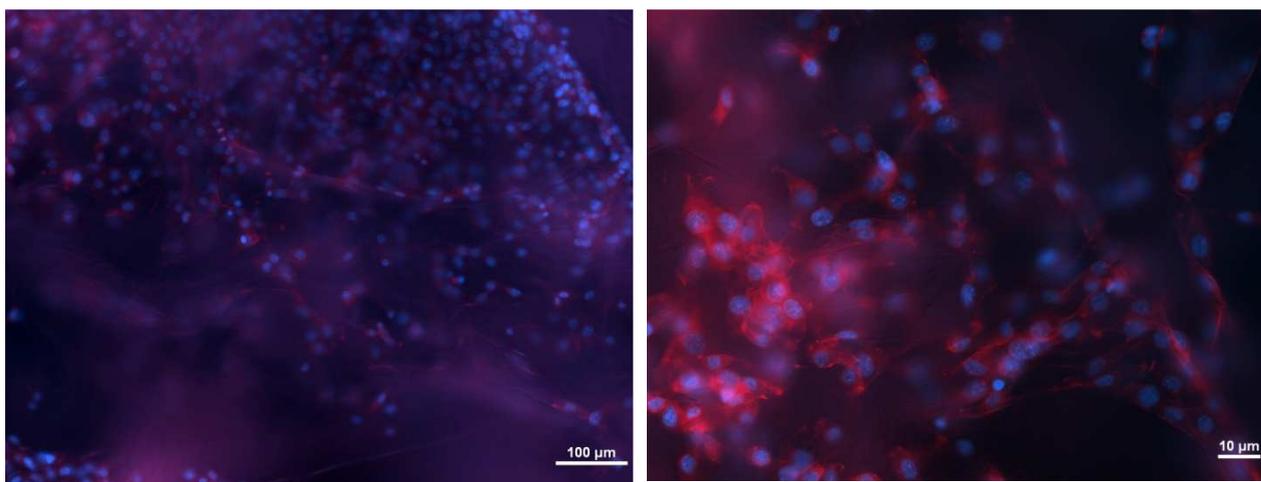
Figure 27. Prolifération cellulaire des hydrogels à 24 et 48 heures.

À partir de la représentation graphique, nous constatons que la prolifération cellulaire à 24 heures est de 33% pour l'hydrogel à base de collagène, et 50% et 20% pour ceux à base de collagène et hyaluronane. Ce qui est intéressant, c'est qu'à 48 heures le degré de prolifération des cellules est plus grand que le témoin.

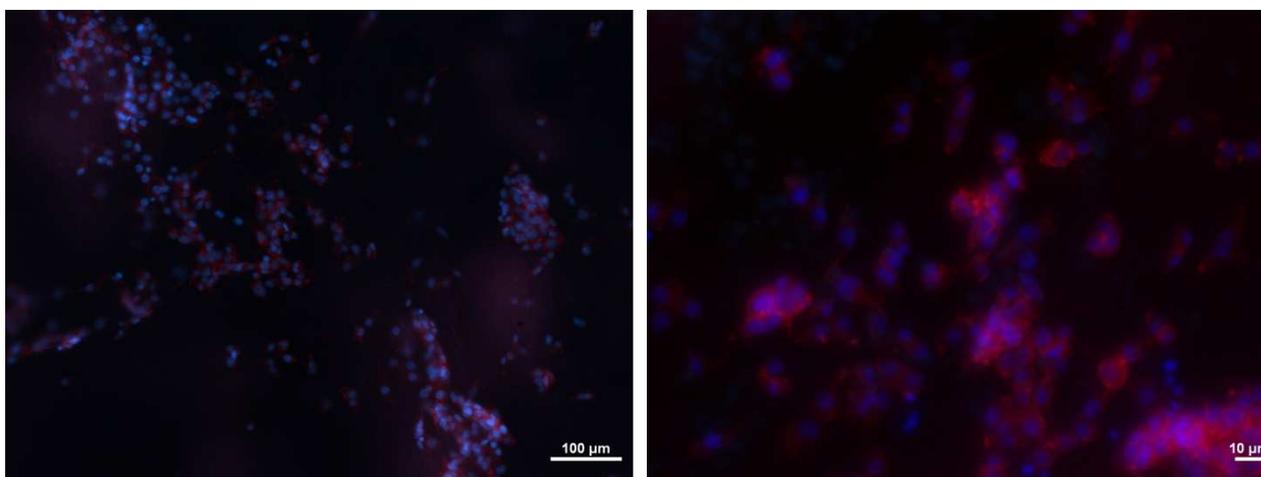
### V.7.3. Visualisation des cellules viables par microscopie confocale à balayage

Après incubation durant 48 heures des matériaux ont été extraits des puits initiaux et transférés à une autre plaque de culture dans un milieu de culture frais. Ainsiensemencés, les matériaux ont été incubés pendant 5 jours supplémentaires (au total 7 jours d'incubation). A la fin de l'incubation, les matériaux peuplés de cellules ont été lavés 2 fois avec du HBSS, fixés, teintés et analysés au microscope à fluorescence, selon la méthode décrite ci-dessous.

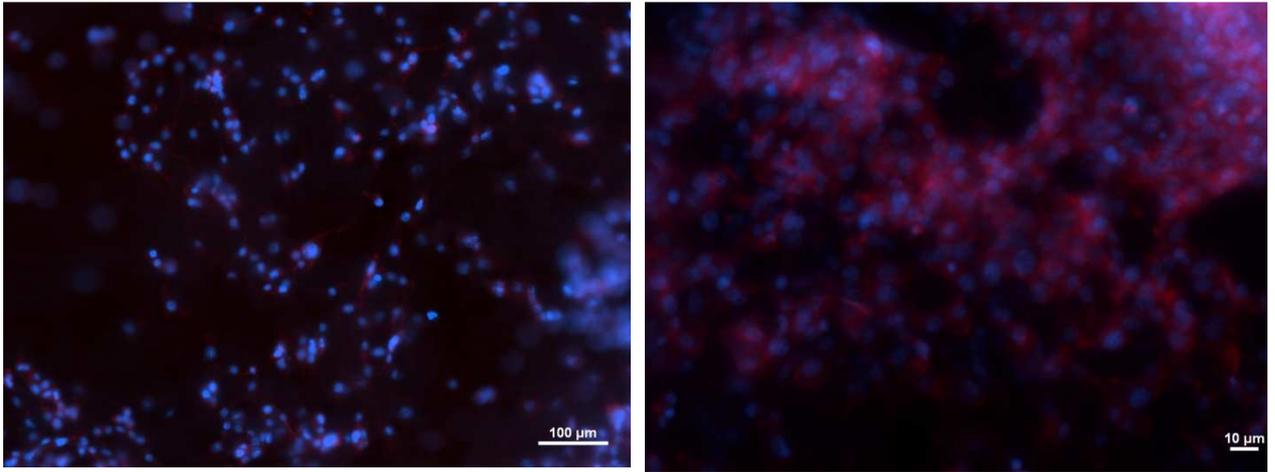
Les matériaux peuplés avec des cellules pour 7 jours ont été analysés par la méthode de microscopie par fluorescence. Ainsi, l'ensemble matériau + culture cellulaire a été fixé dans une solution de para-formaldéhyde à 4% pendant 1 heure à température ambiante, puis introduit pour 30 min à 4 °C avec de la solution de Triton X-100 à 10%. Après les traitements, les matériaux ont été colorés par la méthode d'immunofluorescence en utilisant la technique de double coloration, décrite en détail dans la littérature [144]. Ainsi, la Phalloïdine-Rhodamine a été utilisée pour révéler les filaments d'actine (rouge) et le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) pour mettre en évidence les noyaux des cellules (en bleu) (Figure 28).



Hydrogel à base de collagène



Hydrogel à base de collagène et hyaluronane (rapport 1:1)



Hydrogel à base de collagène et hyaluronane (rapport 5:1)

Figure 28. Images de microscopie confocale pour les hydrogels.

Outre les tests de viabilité qui ont été favorables, l'analyse des images montre que les noyaux des cellules (couleur bleue) sont ronds et ne sont pas modifiés, et les filaments d'actine (couleur rouge) se sont développés de manière uniforme dans tout le matériau.

A partir de ces tests, il est constaté que les hydrogels formés peuvent être utilisés avec succès dans des applications biomédicales, étant biocompatibles et avec la capacité de soutenir et favoriser la prolifération cellulaire.

## Conclusions

1. La manière de faire varier le pH représente le paramètre le plus influent du processus de mélange.
2. En travaillant avec des solutions standardisées de composants purifiés (atelocollagène, hyaluronane et gellane) dont la teneur en sels la plus basse possible, le domaine de pH qui assure une faible auto-association des chaînes macromoléculaires se situe entre les valeurs de 5 et 9. Dans les mêmes conditions, la concentration totale maximale possible pour l'atelocollagène en mélange binaire avec les polysaccharides, dans des conditions de faible enchevêtrement, est de 0,150 g/dL.
3. Le gellane s'est avéré être le composant le plus sensible dans la production de systèmes hétérogènes colloïdaux. C'est la raison pour laquelle les mélanges qui contiennent du gellane peuvent être préparés seulement après une correction du pH de la solution d'atelocollagène avant son utilisation, ou en utilisant des systèmes tampon organiques à une valeur du pH de 9,0.
4. L'hydrophilie des composants a une importance particulière dans la réalisation des diagrammes de phase binaire. Les polysaccharides sont beaucoup plus hydrophiles par rapport aux scléroprotéines.
5. L'obtention des diagrammes ternaires est possible par l'utilisation des composants aussi proches que possible de leur état natif et avec un contenu de sel réduit.
6. Ces conditions sont imposées comme prémisses importants dans la production de substrats biomédicaux basés sur des biopolymères naturels, dans le but d'imiter la matrice extracellulaire, et afin d'éviter des milieux hypertoniques/hyper-osmotiques incommodes pour les cellules.
7. Dans la gamme de fréquence 0.01-20 rad/sec les hydrogels à base de collagène et hyaluronane présentent un comportement élastique prédominant.

8. L'analyse thermique confirme la croissance de la stabilité thermique des gels par rapport aux caractéristiques thermiques du collagène pur.

9. Les tests de cytotoxicité et les études de viabilité cellulaire ont montré que les matériaux obtenus ne sont pas cytotoxiques et, d'ailleurs, ont la capacité de soutenir et de promouvoir l'adhésion et la prolifération des cellules. Les images de microscopie confocale ont montré que les cellules se développent à l'intérieur du matériau sans souffrir de changements morphologiques et structurels. En conclusion, les recherches effectuées ont conduit à des résultats qui permettent d'affirmer que les hydrogels obtenus à base de collagène et de polysaccharides peuvent avoir des applications biomédicales.

## Références

1. Y.-C. Lin, F. Tan, K.G. Marra, S.-S. Jan, D.-C. Liu, *Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications*, *Acta Biomaterialia*, 2009, 5, 2591–2600.
2. Z. Chen, X. Mo, F. Qing, *Electrospinning of collagen–chitosan complex*, *Materials Letters*, 2007, 61, 3490–3494.
3. K.-H. Chung, K. Bhadriraju, T.A. Spurlin, R.F. Cook, A.L. Plant, *Nanomechanical Properties of Thin Films of Type I Collagen Fibrils*, *Langmuir*, 2010, 26(5), 3629–3636.
4. D. Puppi, F. Chiellini, A.M. Piras, E. Chiellini, *Polymeric materials for bone and cartilage repair*, *Progress in Polymer Science*, 2010, 35, 403–440.
5. A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Gawron, J. Kozłowska, A. Planecka, *Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47, 570–577.
6. B.R. Olsen, *Matrix molecules and their ligands*, în R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, *Principles of tissue engineering*, Elsevier Academic Press, New York, 2007, 101–120.
7. D.A.D. Parry, J.M. Squire, *Fibrous proteins: new structural and functional aspects revealed*, în D.A.D. Parry, J.M. Squire, *Advances in protein chemistry: Fibrous proteins: coiled-coils, collagen and elastomers*, Elsevier Academic Press, 2005, 70, 1–10.
8. B. Brodsky, A.V. Persikov, *Molecular structure of the collagen triple helix*, în D.A.D. Parry, J.M. Squire, *Advances in protein chemistry: Fibrous proteins: coiled-coils, collagen and elastomers*, Elsevier Academic Press, 2005, 70, 301–339.
9. Z. Chen, X. Mo, C. He, H. Wang, *Intermolecular interactions in electrospun collagen-chitosan complex nanofibers*, *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72, 410–418.
10. D.I. Zeugolis, R.G. Paul, G. Attenburrow, *Post-self-assembly experimentation on extruded collagen fibres for tissue engineering applications*, *Acta Biomaterialia*, 2008, 4, 1646–1656.
11. M.C. Popescu, C. Vasile, D. Macocinschi, M. Lungu, O. Crăciunescu, *Biomaterials based on new polyurethane and hydrolyzed collagen, k-elastin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(5), 646–653.
12. P. Fratzl, *Collagen: structure and mechanics, an Introduction*, în P. Fratzl, *Collagen structure and mechanics*, Springer Science+Business Media, 2008, 1–6.
13. L. Sang, X. Wang, Zh. Chen, J. Lu, Z. Gu, X. Li, *Assembly of collagen fibrillar networks in the presence of alginate*, *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82, 1264–1270.

14. D. Velegol, F. Lanni, *Cell traction forces on soft biomaterials. I. Microrheology of type I collagen gels*, Biophysical Journal, 2001, 81, 1786–1792.
15. O. Latinovic, L.A. Hough, H.D. Ou-Yang, *Structural And Micromechanical Characterization Of Type I Collagen Gels*, Journal of Biomechanics, 2010, 43, 500–505.
16. M.M. Horn, V.C. A. Martins, A.M. de Guzzi Plepis, *Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics*, Carbohydrate Polymers, 2009, 77, 239–243.
17. H.-O. Ho, L.-H. Lin, M.-T. Sheu, *Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier*, Journal of Controlled Release, 1997, 44, 103–112.
18. A. Gautieri, S. Vesentini, F.M. Montecvecchi, A. Redaelli, *Mechanical properties of physiological and pathological models of collagen peptides investigated via steered molecular dynamics simulations*, Journal of Biomechanics, 2008, 41, 3073–3077.
19. E.Y. Jones, A. Miller, *Analysis of structural design features in collagen*, Journal of Molecular Biology, 1991, 218(1), 209–219.
20. O.S. Rabotyagova, P. Cebe, D.L. Kaplan, *Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation*, Materials Science and Engineering C, 2008, 28, 1420–1429.
21. J. Bella, B. Brodsky, H.M. Bermanl, *Hydration structure of a collagen peptide*, Structure, 1995, 3(9), 893–906.
22. M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero, M.P. Montero, *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*, Food Hydrocolloids, 2011, 25(8), 1813–1827.
23. L. Bădulescu, *Biochimie Horticolă*, 2010, 52–63.
24. L.S. Nair, C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*, Progress in Polymer Science, 2007, 32, 762–798.
25. B.D. Hames, N.M. Hooper, *Biochemistry*, BIOS Scientific Publishers Limited, 2000, Oxford, UK, 19–63.
26. <http://umfstudent.files.wordpress.com/2012/02/curs-ii-proteine-structura.pdf>
27. M. Cârsteanu, C. Vlădescu, *Colagenul, biochimie și fiziologie*, Ed. Academiei, 1982.
28. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D., *Watson Molecular Biology of The Cell*, Garland Publishing, New York, 1994.
29. V. Trandafir, G. Popescu, M. G. Albu, H. Iovu, M. Georgescu, *Bioproduse pe baza de colagen*, Ars Docendi 2007, ISBN 978-973-558-291-3, 23.

30. J. Myllyharju, *Intracellular Post-Translational Modifications of Collagens*, în J. Brinckmann, H. Notbohm, P.K. Müller, *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005, 115–147.
31. D.J. Prockop, K.I. Kivirikko, *Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy*, Annual Review of Biochemistry, 1995, 64, 403–434.
32. J. Myllyharju, K.I. Kivirikko, *Collagens and collagen-related diseases*, Annals of Medicine, 2001, 33, 7–21.
33. M. Colt, M.D. Bucevschi, *Valorificarea neconvențională A Pieilor*, Ed. Gh.Ascachi, 1999, 308.
34. V. Trandafir, G. Popescu, M.G. Albu, H. Iovu, M. Georgescu, *Bioproduse pe bază de colagen*, ARS Docendi, 2007, 53.
35. N.C. Avery and A.J. Bailey, *Restraining Cross-Links Responsible for the Mechanical Properties of Collagen Fibers: Natural and Artificial*, în P. Fratzl (ed.), *Collagen: Structure and Mechanics*, Springer Science+Business Media, LLC 2008.
36. Gh. Chiriță, M. Chiriță, *Chimia pielii*, Ed. Institutul Politehnic Iași, 1987, 229–360.
37. D. Stamoj, M. Grimmer, K. Salchert, Ti. Pompe, C. Werner, *Heparin intercalation into reconstituted collagen I fibrils: Impact on growth kinetics and morphology*, Biomaterials, 2008, 29, 1–14.
38. J.A. Hubbell, *Materials as morphogenetic guides in tissue engineering*, Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14, 551–558.
39. N. Olmo, J. Turnay, J.I. Herrera, J.G. Gavilanes, M.A. Lizarbe, *Kinetics of in vivo degradation of sepiolite-collagen complexes: Effect of glutaraldehyde treatment*, Journal of Biomedical Materials Research, 1996, 30, 77-84.
40. S.-W. Tsai, Y.-H. Cheng, Y. Chang, H.-L. Liu, W.-B. Tsai, *Type I collagen structure modulates the behavior of osteoblast-like cells*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2010, 41, 247–251.
41. W. Friess, M. Schlapp, *Effects of processing conditions on the rheological behavior of collagen dispersions*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001, 51, 259–265.
42. R. Kumar, R. Sripriya, S. Balaji, M.S. Kumar, P.K. Sehgal, *Physical characterization of succinylated type I collagen by Raman spectra and MALDI-TOF/MS and in vitro evaluation for biomedical applications*, Journal of Molecular Structure, 2011, 994, 117–124.
43. K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, *Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels*, Acta Biomaterialia, 2010, 6, 409–417.

44. K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Preparation and characterization of cross-linked collagen phospholipid polymer hybrid gels*, *Biomaterials*, 2007, 28, 1–8.
45. Ch. Helary, I. Bataille, A. Abed, C. Illoul, A. Anglo, L. Louedec, D. Letourneur, A. Meddahi-Pellé, M.M. Giraud-Guille, *Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes*, *Biomaterials*, 2010, 31, 481–490.
46. C.L. Jenkins, R.T. Raines, *Insights on the conformational stability of collagen*, *Natural Product Reports*, 2002, 19, 49–59.
47. C.H. Lee, A. Singla, Y. Lee, *Biomedical Applications Of Collagen*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 221, 1–22.
48. X. Wang, L. Sang, D. Luo, X. Li, *From collagen–chitosan blends to three-dimensional scaffolds: The influences of chitosan on collagen nanofibrillar structure and mechanical property*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 82, 233–240.
49. D.P. DeVore, *Collagen as an ophthalmic biomaterial*, in: D.L. Wise, D.J. Trantolo, D.E. Altobelli, M.J. Yaszemski, J.D. Gresser, E.R. Schwartz (Eds.), *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Marcel Dekker, New York, 1995, 1233–1260.
50. G.G. d’Ayala, M.Malinconico, P.Laurienzo, *Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches*, *Molecules*, 2008, 13, 2069–2106.
51. C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*, *Progress in Polymer Science*, 2009, 34, 641–678.
52. D. de Britto, S.P. Campana-Filho, *Kinetics of the thermal degradation of chitosan*, *Thermochimica Acta*, 2007, 465, 73–82.
53. K. Ogawa, T. Yui, K. Okuyama, *Three D structures of chitosan*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, 34, 1–8.
54. W. Xia, P. Liu, J. Zhang, J. Chen, *Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides*, *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2), 170–179.
55. F.R. de Abreu, S.P. Campana-Filho, *Characteristics and properties of carboxymethylchitosan*, *Carbohydrate Polymers*, 2009, 75, 214–221.
56. C.G.A.Lima, R.S. de Oliveira, S.D. Figueiró, C.F. Wehmann, J.C. Góes, A.S.B. Sombra, *DC conductivity and dielectric permittivity of collagen-chitosan films*, *Materials Chemistry and Physics*, 2006, 99, 284–288.
57. C. Zhou, Q. Wu, *A novel polyacrylamide nanocomposite hydrogel reinforced with natural chitosan nanofibers*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 84, 155–162.
58. W. Sajomsang, *Synthetic methods and applications of chitosan containing pyridylmethyl moiety and its quaternized derivatives*, *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80, 631–647.

59. N.M. Alves, J.F. Mano, *Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications*, International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43, 401–414.
60. M.-T. Yen, J.-H. Yang, J.-L. Mau, *Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells*, Carbohydrate Polymers, 2009, 75, 15–21.
61. S.-H. Lim, S.M. Hudson, *Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group*, Carbohydrate Research, 2004, 339, 313–319.
62. M. Rinaudo, *Chitin and chitosan: Properties and applications*, Progress in Polymer Science, 2006, 31, 603–632.
63. G. Ma, D. Yang, Y. Zhou, M. Xiao, J.F. Kennedy, J. Nie, *Preparation and characterization of water-soluble N-alkylated chitosan*, Carbohydrate Polymers, 2008, 74, 121–126.
64. E.S. Abdou, K.S.A. Nagy, M.Z. Elsabee, *Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources*, Bioresource Technology, 2008, 99, 1359–1367.
65. M.-T. Yen, J.-H. Yang, J.L. Mau, *Antioxidant properties of chitosan from crab shells*, Carbohydrate Polymers, 2008, 74, 840–844.
66. R. Jayakumar, M. Prabakaran, S.V. Nair, S. Tokura, H. Tamura, N. Selvamurugan, *Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications*, Progress in Materials Science, 2010, 55, 675–709.
67. J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, 57, 19–34.
68. M.R. Rekha, C.P. Sharma, *Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption*, Journal of Controlled Release, 2009, 135, 144–151.
69. S. Şenel, S.J. McClure, *Potential applications of chitosan in veterinary medicine*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, 56, 1467–1480.
70. A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska, C.J. Kennedy, T.J. Wess, *Molecular interactions in collagen and chitosan blends*, Biomaterials, 2004, 25, 795–801.
71. L. Rügheimer, J. Olerud, C. Johnsson, T. Takahashi, K. Shimizu, P. Hansell, *Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status*, Matrix Biology, 2009, 28, 390–395.
72. A.D. Baldwin, K.L. Kiick, *Polysaccharide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials*, Biopolymers, 2010, 94(1), 128-140.

73. A. Maleki, A.-L. Kjřniksen, B. Nystrřm, *Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents*, Carbohydrate Research, 2007, 342, 2776–2792.
74. Y. Luo, K.R. Kirker, G.D. Prestwich, *Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery*, Journal of Controlled Release, 2000, 69, 169–184.
75. G.D. Prestwich, *Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine*, Journal of Controlled Release, 2011, 155(2), 193-199.
76. R.H. Tammi, A. Kultti, V.-M. Kosma, R. Pirinen, P. Auvinen, M.I. Tammi, *Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan*, Seminars in Cancer Biology, 2008, 18, 288–295.
77. J.Choi, J.-K. Kim, J.-H. Kim, D.-K. Kweon, J.-W. Lee, *Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: A comparative study*, Carbohydrate Polymers, 2010, 79, 1080–1085.
78. M.A. Serban, G. Yang, G.D. Prestwich, *Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative*, Biomaterials, 2008, 29, 1388-1399.
79. Y. Yang, L.J. Kaufman, *Rheology and Confocal Reflectance Microscopy as Probes of Mechanical Properties and Structure during Collagen and Collagen/Hyaluronan Self-Assembly*, Biophysical Journal, 2009, 96, 1566–1585.
80. K.P. Patil, D.K. Patil, B.L. Chaudhari, S.B. Chincholkar, *Production of hyaluronic acid from Streptococcus zooepidemicus MTCC 3523 and its wound healing activity*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(3), 286–288.
81. X. Jia, G. Colombo, R. Padera, R. Langer, D.S. Kohane, *Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid*, Biomaterials, 2004, 25, 4797–4804.
82. W.Wang, *A novel hydrogel crosslinked hyaluronan with glycol chitosan*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2006, 17, 1259–1265.
83. M. Zhang, S.P. James, *Silylation of hyaluronan to improve hydrophobicity and reactivity for improved processing and derivatization*, Polymer, 2005, 46, 3639–3648.
84. R.T. Moorhouse, G.T. Colegrove, P.A. Sandford, J.K. Baird, K.S. Chang, *PS-60: A new gel-forming polysaccharide in Solution properties of polysaccharides*, P.A. Brandt Edt., ACS Symposium Series, vol. 150, American Chemical Society, Washington D.C., 1981, 111-124.
85. K.M. Manjanna, T.M. Pramod Kumar, B. Shivakumar, *Natural Polysaccharide Hydrogels As Novel Excipients For Modified Drug Delivery Systems*, International Journal of ChemTech Research, 2010, 2(1), 509-525.

86. V. Crescenzi, M. Dentini, T. Coviello, *Solution and gelling properties of microbial polysaccharides of industrial interest: the case of gellan* in *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, E.A. Dawes, Ed.; Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1990, 227-284.
87. G. Ciardelli, V. Chiono, G. Vozzi, M. Pracella, A. Ahluwalia, N. Barbani, C. Cristallini, P. Giusti, *Blends of poly-(epsilon-caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications*, *Biomacromolecules*, 2005, 6, 1961–1976.
88. A. Benichou, A. Aserin, R. Lutz, N. Garti, *Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity*, *Food Hydrocolloids*, 2007, 21, 379–391.
89. L. Jiménez-Castaño, R. López-Fandiño, A. Olano, M. Villamiel, *Study on blactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability*, *Food Chemistry*, 2005, 93, 689–695.
90. L. Jiménez-Castaño, M. Villamiel, R. López-Fandiño, *Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass*, *Food Hydrocolloids*, 2007, 21, 433–443.
91. J.M. Rodríguez Patino, A.M.R. Pilosof, *Proteine-polysaccharide interactions at fluid interfaces*, *Food Hydrocolloids*, 2011, 25, 1925–1937.
92. E. Dickinson, *Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems*, *Food Hydrocolloids*, 2003, 17, 25–40.
93. S.S. Silva, B.J. Goodfellow, J. Benesch, J. Rocha, J.F. Mano, R.L. Reis, *Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes*, *Carbohydrate Polymers*, 2007, 70, 25–31.
94. F.L. Jara, A.M.R. Pilosof, *Glass transition temperature of protein/polysaccharide co-dried mixtures as affected by the extent and morphology of phase separation*, *Thermochimica Acta*, 2009, 487, 65–73.
95. D.J. McClements, *Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides*, *Biotechnology Advances*, 2006, 24, 621–625.
96. M.G. Cascone, B. Sim, S. Downes, *Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone*, *Biomaterials*, 1995, 16(7), 569–574.
97. S.D. Figueiro, A.A.M. Macêdo, M.R.S. Melo, A.L.P. Freitas, R.A. Moreira, R.S. de Oliveira, J.C. Góes, A.S.B. Sombra, *On the dielectric behaviour of collagen–algal sulfated polysaccharide blends: effect of glutaraldehyde crosslinking*, *Biophysical Chemistry*, 2006, 120, 154–159.

98. R.N. Chen, G.M. Wang, C.H. Chen, H.O. Ho, M.T. Sheu, *Development of N, O-(carboxymethyl) chitosan/collagen matrixes as a wound dressing*, *Biomacromolecules*, 2006, 7, 1058–1064.
99. L. Ma, C.Y. Gao, Z.W. Mao, J. Zhou, J.C. Shen, X.Q. Hu, C. Han, *Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering*, *Biomaterials*, 2003, 24, 4833–4841.
100. X.H. Wang, D.P. Li, W.J. Wang, Q.L. Feng, F.Z. Cui, Y.X. Xu, X.H. Song, M. van der Werf, *Cross-linked collagen/chitosan matrix for artificial livers*, *Biomaterials*, 2003, 24, 3213–3220.
101. S.B. Lee, Y.H. Kim, M.S. Chong, Y.M. Lee, *Preparation and characteristics of hybrid scaffolds composed of  $\beta$ -chitin and collagen*, *Biomaterials*, 2004, 25, 2309–2317.
102. Y.K. Lin, D.C. Liu, *Studies of novel hyaluronic acid–collagen sponge materials composed of two different species of type I collagen*, *Journal of Biomaterials Applications*, 2007, 21, 265–281.
103. K. Pietrucha, *Changes in denaturation and rheological properties of collagen–hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 36, 299–304.
104. L. Klouda, A.G. Mikos, *Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 68, 34–45.
105. C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, L. Auditore, R.C. Barnà, D. De Pasquale, U. Emanuele, A. Trifirò, M. Trimarchi, *Synthesis of polyethylene oxide hydrogels by electron radiation*, *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 102, 820–824.
106. Y. Ogushi, S. Sakai, K. Kawakami, *Synthesis of enzymatically-gellable carboxymethylcellulose for biomedical applications*, *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 2007, 104(1), 30–33.
107. S.R. Van Tomme, G. Storm, W.E. Hennink, *In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 355, 1–18.
108. A. Stathopoulos, P. Klonos, A. Kyritsis, P. Pissis, C. Christodoulides, J.C. Rodríguez Hernández, M. Monleón Pradas, J.L. Gómez Ribelles, *Water sorption and polymer dynamics in hybrid poly(2-hydroxyethyl-co-ethyl acrylate)/silica hydrogels*, *European Polymer Journal*, 2010, 46, 101–111.
109. T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, F. Alhaique, *Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*, *Journal of Controlled Release*, 2007, 119, 5–24.

110. Da-yong Teng, Z.-ming Wu, X.-ge Zhang, Y.-xia Wang, C. Zheng, Z. Wang, C.-xing Li, *Synthesis and characterization of in situ cross-linked hydrogel based on self-assembly of thiol-modified chitosan with PEG diacrylate using Michael type addition*, *Polymer*, 2010, 51, 639–646.
111. H.K. Can, B.K. Denizli, A. Güner, Z.M.O. Rzaev, *Effect of functional crosslinking agents on preparation and swelling properties of dextran hydrogels*, *Carbohydrate Polymers*, 2005, 59, 51–56.
112. V. Dulong, S. Lack, D. Le Cerf, L. Picton, J.P. Vannier, G. Muller, *Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization*, *Carbohydrate Polymers*, 2004, 57, 1–6.
113. K.T. Nguyen, J.L. West, *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*, *Biomaterials*, 2002, 23, 4307–4314.
114. X.Z. Shu, Y. Liu, F.S. Palumbo, Y. Luo, G.D. Prestwich, *In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering*, *Biomaterials*, 2004, 25, 1339–1348.
115. Z.M. Wu, X.G. Zhang, C. Zheng, C.X. Li, S.M. Zhang, R.N. Dong, D.M. Yu, *Disulfide-crosslinked chitosan hydrogel for cell viability and controlled protein release*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 37, 198–206.
116. M. Hamidi, A. Azadi, P. Rafiei, *Hydrogel nanoparticles in drug delivery*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 1638–1649.
117. J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney, *Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials*, *Biomaterials*, 1999, 20, 45–53.
118. S.K.H. Gulrez, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, *Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications*, in A. Carpi, *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*, InTech Publisher, ISBN 978-953-307-268-5, 2011, 117–150.
119. K. Pal, A.K. Banthia, D.K. Majumdar, *Polymeric hydrogels: characterization and biomedical applications – a mini review*, *Designed monomers and polymers*, 2009, 12, 197–220.
120. M.E. Byrne, K. Park, N.A. Peppas, *Molecular imprinting within hydrogels*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54, 149–161.
121. N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *Hydrogels in pharmaceutical formulations*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50, 27–46.
122. H. Omidian, K. Park, *Introduction to hydrogels*, in R.M. Ottenbrite, K. Park, T. Okano, *Biomedical applications of hydrogels Handbook*, Springer Science+Business Media, New York, USA, 2010, ISBN 978-1-4419-5918-8, 1–15.

123. R.K. Bose, K.K.S. Lau, *Initiated CVD of Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) Hydrogels: Synthesis, Characterization and in vitro Biocompatibility*, Chemical Vapor Deposition, 2009, 15, 150–155.
124. X. Zhu, P. Lu, W. Chen, J. Dong, *Studies of UV crosslinked poly(N-vinylpyrrolidone) hydrogels by FTIR, Raman and solid-state NMR spectroscopies*, Polymer, 2010, 51, 3054–3063.
125. S. Lack, V. Dulong, D. Le Cerf, L. Picton, J.F. Argillier, G. Muller, *Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study*, Polymer Bulletin, 2004, 52, 429–436.
126. J. Kuang, K.Y. Yuk, K.M. Huh, *Polysaccharide-based superporous hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties*, Carbohydrate Polymers, 2011, 83, 284–290.
127. J.M. Rosiak, F. Yoshii, *Hydrogels and their medical applications*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 1999, 151, 56–64.
128. D.M. Devine, S.M. Devery, J.G. Lyons, L.M. Geever, J.E. Kennedy, C.L. Higginbotham, *Multifunctional polyvinylpyrrolidinone-polyacrylic acid copolymer hydrogels for biomedical applications*, International Journal of Pharmaceutics, 2006, 326, 50–59.
129. K.Y. Lee, D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering*, Chemical Reviews, 2001, 101(7), 1869–1879.
130. J.L. Drury, D.J. Mooney, *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*, Biomaterials, 2003, 24, 4337–4351.
131. A.S. Hoffman, *Hydrogels for biomedical applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54, 3–12.
132. S.S. Maier, N. Badea, V. Maier, M. Pruneanu, Romanian Patent RO123256 B1 / 2011.
133. S.S. Maier, V. Maier, M. Pruneanu, C.M. Ignat, Romanian Patent RO126403 A2 / 2009.
134. R. Tenni, M. Sonaggere, M. Viola, B. Bartolini, M. Enrica Tira, A. Rossi, E. Orsini, A. Ruggeri, V. Ottani, *Self-aggregation of fibrillar collagens I and II involves lysine side chains*, Micron, 2006, 37, 640–647.
135. F. Gobeaux, G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M.-M. Giraud-Guille, E. Belamie, *Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study*, Journal of Molecular Biology, 2008, 376, 1509–1522.
136. Y. Yang, L.J. Kaufman, *Rheology and Confocal Reflectance Microscopy as Probes of Mechanical Properties and Structure during Collagen and Collagen/Hyaluronan Self-Assembly*, Biophysical Journal, 2009, 96, 1566–1585.
137. G.-K. Tana, D.L.M. Dinnes, J.J. Cooper-White, *Modulation of collagen II fiber formation in 3-D porous scaffold environments*, Acta Biomaterialia, 2011, 7, 2804–2816.

138. A. Cesàro, A. Gamini, L. Navarini, *Supramolecular structure of microbial polysaccharides in solution: from chain conformation to rheological properties*, *Polymer*, 1992, 33, 4001–4008.
139. M.R. Kasaai, *Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data*, *Carbohydrate Polymers*, 2007, 68, 477–488.
140. M. Kosakai, Z. Yosizawa, *A partial modification of the carbazole method of Bitter and Muir for quantitation of hexuronic acids*, *Analytical Biochemistry*, 1979, 93, 295–298.
141. V. Tolstoguzov, *Compositions and Phase Diagrams for Aqueous Systems Based on Proteins and Polysaccharides*, in: *Microcompartmentation and Phase Separation in Cytoplasm*, *International Review of Cytology*, vol. 192, H. Walter, D.E. Brooks, P.A. Sreere (Eds.), Academic Press, San Diego, Canada, 2000, 3–32.
142. P. Uppamoochikkal, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, *Orientation of Tie-Lines in the Phase Diagram of DOPC/DPPC/Cholesterol Model Biomembranes*, *Langmuir*, 2010, 26, 17363–17368.
143. T.M. Freyman, I.V. Yannas, L.J. Gibson. *Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering*, *Progress Materials Science*, 2001, 46, 273–82.
144. J.K. Dzandu, M.E. Deh, D.L. Barratt, G.E. Wise, *Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1984, 81, 1733-1737.

## Abstract

Obtaining "cyto-favourable" substrates able to support tissue regeneration leads to use biomaterials holding cellular recognition domains, as scleroproteins and some polysaccharides as examples. Cellules membranes specific to conjunctive tissues have mechanisms making easier the anchoring to solid or gel substrates where macromolecules or fibrils of (aceto)collagen, associated or not to hyaluronic acid, are found. Such substrates may be generated using spontaneous molecular gathering (as in native collagen restructuration to fibrils), or physico-chemically induced (as the preparation of mixed hydrogels then transformed in cryo- or vitri-gels).

In this thesis, were studied the obtaining and purification of bio-macromolecular presursors necessary to obtaining "cyto-favourable" substrates, and the procedures to generate and characterize them. Used restructuration methods are of physico-chemical nature (controlled co-precipitation in binary and ternary mixtures of acetocollagen and sodium hyaluronate) or chemical one (crosslinking).

The mixture of acetocolagen (aK) with two polysaccharides, sodium hyaluronate (NaHyal) and gellan were investigated. Formulations and optimal conditions were established to obtain hydrogels with controlled rheological characteristics, and reactivity and morphology able to allow fibroplast fixation and proliferation. Hydrogels and cryogels prepared from 5:1 aK:NaHyal crosslinked with 1,4-butanediol diglycidyl ether were efined as the best materials we have prepared. They do not show any cytotoxicity and the ensure the cellular viability within standard cellule culture media. The cryogel morphology shows macro-porosity depending on the formulation but a few on the obtaining process. The presence of gellan in the mixtures leads to a phase separation, even at low concentration.

## Résumé

L'obtention de substrats „cyto-favorables”, aptes à soutenir la régénération tissulaire, impose l'utilisation de biomatériaux qui portent des domaines de reconnaissance cellulaire, comme par exemple les scléroprotéines et certains polysaccharides. La membrane des cellules spécifiques aux tissus conjonctifs dispose de mécanismes qui facilitent l'ancrage aux substrats solides ou à l'état de gel où se retrouvent des macromolécules ou des fibrilles de (atelo) collagène, associées ou non à l'acide hyaluronique. On peut générer de tels substrats par des techniques de rassemblement moléculaire spontané ordonné (tout comme dans le cas de la restructuration du collagène quasi-natif pour former des fibrilles), ou induite physico-chimiquement ensuite stabilisé morphologiquement (tout comme dans le cas de la préparation des hydrogels mixtes, atelocollagène-hyaluronate de sodium, diversement réticulés ensuite transformés en cryo- ou vitri-gels).

Dans le cadre de la thèse, nous étudions les moyens d'obtention et de purification des précurseurs bio-macromoléculaires nécessaires, par la suite, à l'obtention de substrats „cyto-favorables”, ainsi que leurs modalités de génération et de caractérisation. Les méthodes de restructuration auxquelles on en appelle sont de nature physico-chimique (la co-précipitation contrôlée dans des mélanges binaires et ternaires d'atlocollagène et d'hyaluronate de sodium), ou chimique (la réticulation par des ponts moléculaires à longueur minimale).

On a étudié les possibilités de mélanger de l'atlocollagène (aK) avec deux types de polysaccharides, le hyaluronate de sodium (NaHyal) et le gellane. On a établi des formulations et les procédures optimales pour obtenir des hydrogels avec des caractéristiques rhéologiques contrôlables, et avec la réactivité et la morphologie capables de permettre la fixation et la prolifération des fibroblastes. On constate que les hydrogels et cryogels obtenus à partir des mélanges 5:1 aK:NaHyal réticulés avec du 1,4-butanediol diglycidyl éther ont des propriétés rhéologiques qui permettent leurs manipulation dans les conditions des techniques de culture cellulaire. Ils ne présentent pas de cytotoxicité et ils assurent la viabilité cellulaire dans les milieux de culture standards. La morphologie des cryogels obtenus montre une macro-porosité qui dépend de la formulation des mélanges et peu la technique d'obtention. La présence de gellane dans les mélanges conduit à une séparation de phases, même à faible concentration, soulignant la diversité des caractéristiques de substrats.