Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Thibault CANCEILL

Le 22 mars 2021

Développement d'un biomatériau naturel, bioactif, dérivé du sang pour la régénération tissulaire

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Sciences et Génie des Matériaux**

Unité de recherche :
CIRIMAT - Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux

Thèse dirigée par
Sophie CAZALBOU et Sabine JONIOT

Jury

Mme Kerstin GRITSCH, Rapporteure
Mme Fabienne JORDANA, Rapporteure
Mme Fani ANAGNOSTOU, Examinatrice
M. Philippe KEMOUN, Examinateur
Mme Vanessa MOBY, Examinatrice
Mme Séverine CAMY, Examinatrice
Mme Sophie CAZALBOU, Directrice de thèse
Mme Sabine JONIOT, Co-directrice de thèse

Remerciements aux membres du jury

Au Pr. Kerstin Gritsch,

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait d'accepter de rapporter ce travail. Nous espérons avoir l'occasion de développer des projets de recherche communs entre nos deux villes dans les prochaines années.

Au Dr. Fabienne Jordana,

Ce fut un honneur pour nous de savoir que vous avez accepté de rapporter notre Thèse. Vos travaux dans le domaine de la régénération tissulaire, notamment osseuse, ont enrichi nos connaissances à ce sujet depuis le début de nos travaux.

Au Pr. Fani Anagnostou,

Nous vous remercions de siéger parmi les membres de ce jury. Vous êtes à l'origine de nombreuses publications concernant les utilisations médicales du lysat plaquettaire qui ont occupé une place majeure dans le développement bibliographique de ce travail.

Au Pr. Philippe Kemoun,

C'est un réel honneur de vous savoir membre du jury de notre Thèse. Votre accompagnement dans notre parcours universitaire a toujours été précieux. Nous espérons à travers ce travail de Thèse avoir donné une suite crédible au Master 2 de qualité durant lequel vous nous aviez encadré.

Au Pr. Séverine Camy,

Nous vous sommes très reconnaissants d'avoir accepté de siéger dans ce jury et en particulier d'en avoir accepté la Présidence. Vos travaux sur l'utilisation du CO_2 supercritique ont été essentiels à notre compréhension du sujet tout au long des travaux.

Au Dr. Vanessa Moby,

C'est un vrai plaisir que de vous savoir membre de notre jury de Thèse. Nos collaborations depuis les journées 2017 de la SFBD ont abouti à la rédaction de nombreuses publications. Nous espérons réellement pouvoir poursuivre ces projets.

Au Dr. Sophie Cazalbou,

Nous souhaitons par ces quelques lignes vous remercier de votre implication dans nos travaux. Votre direction a été efficace, y compris durant les confinements survenus à la fin des travaux. Nous espérons continuer de travailler avec vous sur ce projet, et bien d'autres encore, pendant longtemps !

Au Dr. Sabine Joniot,

Nous vous remercions très sincèrement d'avoir accepté de co-diriger ces travaux. Cela marque une nouvelle fois l'accompagnement qui a été le vôtre dans nos travaux, depuis notre thèse d'exercice et au cours de toutes les étapes de notre parcours universitaire. Nous vous en sommes très reconnaissants !

Remerciements

A mes parents, vous qui m'avez toujours appris à donner le meilleur de moi-même pour faire du travail une réussite, vous qui avez toujours su me tirer vers le haut. Vous êtes les deux modèles sur lesquels se base mon quotidien. Je vous aime.

A ma sœur, ma Roxy, j'ai été si fier de venir assister à ta remise des diplômes au mois de janvier 2020. Tu resplendis de bonheur, tu es la réussite incarnée à mes yeux (sauf à Mario Kart mais bon). Love you !

A Granny, pour tous ces repas du vendredi qui ont accompagné mes journées de labo. J'espère te rendre fière – par ce nouveau travail accompli – du petit garçon à qui tu as appris à lire !

A Mamie Colette, à nos coups de téléphone pour rester « loin des yeux, près du cœur ». Tu n'imagines pas la joie que j'ai à te retrouver à Toulouse ou à Villeneuve !

A mes grands-pères Jacques et Michel à qui je pense chaque jour. Je reste persuadé de votre regard bienveillant sur mon quotidien de là où vous êtes. J'espère être digne du sérieux et de la motivation que vous m'avez inculqués.

A mes tantes Anne-Marie et Christine. Les repas de famille et les galettes sont chaque fois l'occasion de partager l'humour qui caractérise notre famille ! Un petit merci supplémentaire à Anne-Marie pour la vérification de calculs un peu en catastrophe pendant la rédaction de cette Thèse !

A Samy et Marjorie et à petit Thomas ! Vous avez suivi l'avancée de mes travaux de recherche toujours avec humour et bienveillance. Vous incarnez une joie de vivre qui fait plaisir à voir. C'est toujours un réel bonheur de vous retrouver avec Sarah mes cousins adorés.

A Sabine et Michel, que je vois moins depuis l'arrivée de l'épidémie mais que j'ai hâte de retrouver à St-Michel pour nos grandes et belles tables de fêtes.

A Gwladys, à nos 400 coups, à nos secrets, à notre amitié tout simplement qui dure depuis presque 15 ans maintenant. L'écrivain Michel Tournier a écrit ce qui caractérise l'attachement que j'ai pour toi : « La terre s'use, l'amitié des âmes jamais ». A ta maman Sophie à qui je dois toujours un gâteau !

A Sophie, qu'auraient été mes années d'assistant sans toi ? De notre voyage en Irlande avec cette fameuse randonnée sous la pluie vêtus de nos ponchos, à nos virées au ski, à Carcassonne, à Albi… ! A tous nos articles. On en a accompli des choses ! Really the best, hâte de te retrouver en Corse ! A Liso(ooooo), j'admire ton parcours, j'adore entendre ta voix à la télé, je ris de nos messages vocaux et de nos alertes infos ! A toute la famille Campana qui m'a si bien accueillie chaque été. Votre four à pizza est un modèle pour moi !

A Lucile, ma binôme forever ! Tu as toujours été si bienveillante avec moi. J'ai une chance infinie de te compter dans mes meilleures amies toi qui es toujours à l'écoute et jamais avare de conseils. Je me réjouis de vous savoir près de moi avec Thibault car je sais que je pourrai toujours compter sur vous.

A Julien (Ju Lien), que le partage de notre bureau n'en soit qu'à ses débuts. Tu es toujours là, toujours disponible pour aider et conseiller. Un ami en or, un vrai lingot ! Nous sommes sur la même longueur d'ondes et nous partageons la même vision de notre profession, c'est un régal d'échanger avec toi. A nos soirées jeux de société avec Adeline qui sait elle aussi être à l'écoute.

A Marion, tu me manques tellement. Que serait le monde sans Whatsapp ? J'aime suivre la vie d'une dentiste en Guyane, j'aime moins les oiseaux qui traversent ton salon pendant nos sessions Skype ! Notre repas chaque été est parmi les plus joyeux de l'année.

A Pierre, notre amitié sans faille est le reflet de nos centres d'intérêts communs ! Du foot au ski, de Fifa à Battlefront. Chaque semaine est l'occasion de se poser et de réfléchir à changer le monde (du football surtout et il y a du boulot !). A l'heure où j'écris ces lignes, nous n'avons toujours pas vaincu la survie sur Sullust.

A Minatchy – Jérôme pardon ! Quel bonheur de te retrouver à Toulouse ! Je souhaite que tes rêves professionnels les plus fous se réalisent. Tu n'en ressortiras que plus grand encore ! Car comme on aime à dire : Il s'agirait de grandir… !

A Charlotte, à nos coups de téléphone (plus rares depuis que la charge de boulot s'en est mêlée), à nos bières au Beergarten. Que notre amitié et notre parcours hospitalo-universitaire continuent comme depuis le premier jour !

A Dam's. Nous pourrions inventer la formule « de l'assistanat nait une amitié » tant nous partageons depuis les débuts concomitants de nos contrats. Maud et toi n'avez cessé d'être bienveillants ces cinq dernières années. Je tiens beaucoup à vous. Petit clin d'œil Mandalorien « Telle est la voie » !

A Sarah, je suis ravi que nos deux années au bureau n'aient été que le commencement de notre amitié. Que les mojitos continuent de couler à flots ! Je fais le vœu que nous nous retrouvions enfin pour ce fameux double avec Philippe et Valérie que j'embrasse et que je remercie pour la confiance qui a été la leur dès mes premiers remplacements.

A la team PPB !
Clem tu as été la première à m'accueillir, tu m'as guidé, tu m'as aidé à prendre mes marques. Je t'en suis si reconnaissant ! J'espère que nos manips seront sans fin ! Nos discussions peuvent durer des heures et sont toujours enrichissantes, et puis « c'est comme ça que la science avance ! ».
Maylis, nos thèses ont avancé en parallèle avec les mêmes joies et les mêmes galères. On s'est toujours compris et j'attache une si grande importance à l'amitié qui est devenue la nôtre grâce au labo !
Clémence, nos destinations de voyage systématiquement communes sont l'image d'une amitié faite pour durer ! Tu es toujours bienveillante, toujours à l'écoute. Vous retrouver avec Edouard est toujours un réel plaisir.
Laure tu es arrivée plus tard mais tu t'es tout de suite intégrée dans la bande PPB pharma, pour notre bonheur à tous !
Simon je te souhaite que ton humour traverse les frontières et que tu puisses t'épanouir dans tes futures expériences à l'étranger.
A tous les membres du bureau que j'ai eu joie à retrouver durant vos passages respectifs au labo ! Léa, Nicolas, Damien : j'espère avoir l'occasion de vous retrouver pour continuer de refaire le monde.
A toute l'équipe de pharma :
Sandrine tu tires l'équipe vers le haut, tu as toujours une solution à tous nos problèmes, tu es pour ainsi dire précieuse. Je te remercie pour toute l'aide que tu as pu m'apporter au quotidien.
Audrey, tu as toi aussi été d'une bienveillance géniale et enrichissante. Tu as su me remotiver même en week end pour aller au bout : merci merci merci !
Fabien le seul avec qui je peux parler foot le matin avec un café et j'espère bien que cela va durer !
Christelle, tu es toujours souriante. Vous faites la paire avec Sandrine, c'est un régal !
Sophie, nous avons moins eu l'occasion d'échanger sur le boulot mais merci de m'avoir accueilli dans cette équipe avec tant de gentillesse.
A l'équipe de Labège, Christophe, Jérémy, David, et tous les autres. Vous m'avez toujours accueilli avec le sourire et nos discussions ont toujours été constructives. J'espère collaborer avec vous encore longtemps. Je pense aussi fort aux (ex)doctorants de l'ENSIACET Camille, Maximilien, Prescilla, Marion : au plaisir de tous nous retrouver une fois le covid derrière nous.

A Damien le 007 des présentations de Thèse, à nos déboires et nos victoires depuis le Master 2. Nos centres d'intérêts communs sont indénombrables ! Et que dire de ce tacle en ski que je n'oublierai jamais ! Nos sessions FIFA pendant le confinement ont été ma dose d'évasion quotidienne ! Garde ta joie de vivre, elle fait ta personnalité hors pair !

A mes amis et collègues à la fac :
Coralie (notre coco), notre amitié s'est révélée depuis ton internat pour mon plus grand plaisir. Tu es une source intarissable de potins géniaux !
Géromine, que nos cafés du vendredi puissent durer encore très longtemps. Tu suis l'avancée de ma thèse depuis le début et je ne doute pas que tu en seras à ce stade-là toi aussi très prochainement !
Margaux, on se croise moins qu'avant mais nos échanges de messages à base de choyeux zanniversaires me font toujours autant rire. Vivement la fin du covid pour reprendre les bases de l'apéro de promo !
Karim, le mardi est le jour clé de la semaine où on fait avancer tous nos projets communs. Tu es toujours plein d'idées nouvelles. Les Macdos du Mardi sont faits pour durer !
Vincent, ton accompagnement depuis 5 ans maintenant est si précieux. Tu as une capacité à motiver les troupes et à faire avancer les projets que je trouve incroyable ! Le seul débat qui nous divise est sportif mais je pense malheureusement qu'il est vain d'espérer te voir un jour devenir arbitre de ballon rond… ! Antoine je te remercie pour ta bienveillance et l'intérêt que tu portes pour ma progression clinique. Franck, tu suis toi aussi mon

parcours avec beaucoup de bienveillance depuis plusieurs années. Je sais que j'ai toujours pu compter sur tes conseils avisés et je t'en suis très reconnaissant !
Matthieu (petit Minty déjà très grand) avec qui on partage la même vision du métier. Notre amitié est faite pour durer dans ces murs et nos allers-retours à Marseille n'étaient que le commencement d'une longue histoire !
Paul et M. Kemoun, vous avez eu beaucoup de bienveillance à mon égard en m'aidant à donner un axe nouveau à mon parcours de recherche. Les discussions que vous proposez sont d'une rare qualité et toujours constructives. Travailler à vos côtés est pour moi enrichissant.
Jean-Noël, tes capacités d'écoute et de conseil ont joué un rôle si important dans l'orientation que j'ai donné à mes travaux que j'espère arriver à exprimer en ces quelques mots l'ampleur de la reconnaissance que j'ai pour toi.
Mathieu pour nos discussions autour du café, tu es toujours souriant et disponible pour donner des conseils justes et précis.
Rémi et Emmanuelle pour nos serial-publis et votre bonne humeur sans égal.
Florent et Antonin je vous suis si reconnaissant de la confiance que vous m'avez accordée en clinique.
Luc, je ne te remercierai jamais assez des précieux conseils que tu m'as donnés pour améliorer ma pratique. Les gardes assurées ensemble pendant le confinement ont été l'occasion de renforcer encore notre amitié.
Cathy pour m'avoir accueilli au DURCO. Ta disponibilité en toutes circonstances est précieuse. Nous avons la même façon de gérer les urgences et j'espère que cela n'en sera que bénéfique à l'avenir du service !
Romain je me réjouis de notre nouvelle collaboration sur les enseignements. On partage le même désir de transmettre et nous l'avons déjà montré dans les thèses que nous encadrons en commun.
A l'équipe de pédo toute entière, vous avez cette capacité que j'admire de transmettre vos sourires les mercredis tout en soignant des enfants pas toujours faciles. Partager les vacations du mercredi à Rangueil avec vous est un vrai plaisir chaque semaine.
Alexia avec qui j'ai le plaisir à partager les vacations du mercredi depuis mon arrivée sur Rangueil. Nous démarrons l'encadrement d'une thèse ensemble, qui sera la première d'une longue série j'en suis persuadé.
A toute l'équipe de chir. Arnaud, Bruno, Sarah, les discussions avec vous sur les cas cliniques sont toujours constructives. Antoine et Leonor, votre disponibilité pour aider et votre bonne humeur dans les couloirs de Rangueil sont une vraie source de motivation.
Pr. Hamel, vous suivez depuis le premier jour l'avancée de mon parcours. Nos petits points rapides du matin sont précieux !
Pr. Armand, je tiens à vous remercier de l'aide que vous nous avez apportée avec Antoine pour les répétitions de nos épreuves respectives. L'avancée de nos parcours en parallèle a été une vraie source de motivation.

A tous mes amis de Plaisance : notre amitié ne s'est jamais essoufflée depuis l'école et le collège !
Jéjé le jé, cet été 2020 passé à geeker m'a rassuré sur notre capacité à revenir aux fondamentaux en cas de nécessité !
Benji il me tarde de venir assister à la consécration de votre bonheur avec Ioana ! La fête sera magnifique !
Nico tu réponds toujours présent pour organiser nos retrouvailles. On attend toujours la crémaillère de ton studio (les voisins un peu moins sans doute !).
Clément, Marie, vous avez choisi l'exil Gersois (hahaha) mais quel bonheur quand on se retrouve ! Toute la nouvelle famille avec Anna, Axel, Chloé, Thomas forme une joyeuse assemblée !
Laura la star d'EDF, l'influenceuse des vidéos sur les Data Scientists ! Ta capacité d'adaptation du Gers à Paris est impressionnante !
Nico mon supporter préféré du Tef. Tu as créé une dynamique de groupe impressionnante avec Jérémy, Maxime, Clément et Simon qui inonde (dans le bon sens du terme) les notifications de nos téléphones au quotidien. Je serai tellement heureux de pouvoir te retrouver chaque semaine au BFF !!!
A mes potes du tennis Vincent, Quentin, Chloé ! Loin des yeux mais sacrément près du cœur !

Pour refermer ces quelques pages, je voulais remercier mes deux directrices de Thèse.
Sabine Joniot, vous m'épaulez depuis la fin de mes études pour me tirer vers le haut. Cette Thèse est la seconde que je réalise avec vous en quelques années, signe fort que notre collaboration est faite pour durer ! Vous avez constitué une équipe de travail au 1er étage qui carbure sans égal !
A Sophie. Grâce à ton aide et ta bonne humeur, j'ai découvert un intérêt majeur pour la recherche dans les matériaux. J'espère que notre collaboration continuera encore longtemps car tu m'as proposé de travailler dans une structure qui désormais me colle à la peau.

Liste des principales abréviations

(Par ordre alphabétique)

AT : Acide Tranexamique

$CaCl_2$: Chlorure de Calcium

BM-CSM : Cellules Stromales Mésenchymateuses issues de la moelle osseuse

CSM : Cellules Stromales Mésenchymateuses

DRX : Analyse par Diffraction des Rayons X

EDX : Analyse Dispersive en Energie

FTIR : Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier

LP : Lysat Plaquettaire

MEB : Microscope Electronique à Balayage

NaCl : Chlorure de Sodium

PRF : Plasma Riche en Fibrine

PRGF : Plasma Riche en Facteurs de Croissance

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

$scCO_2$: Dioxyde de Carbone Supercritique

VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor

Table des Matières

Introduction générale **5**
Références de l'Introduction 10
Première partie : Du phénomène de coagulation aux dérivés plaquettaires **12**
I. Principes généraux de la coagulation sanguine 13
II. Les principaux Concentrés Plaquettaires 16
1. Le Plasma Riche en Plaquettes (PRP) 16
2. Le Plasma Riche en Facteurs de Croissance (PRGF) 19
3. Le Plasma Riche en Fibrine (PRF) et ses déclinaisons 21
4. L'isolation plaquettaire par la technique du *Buffy Coat* 23
5. Le Lysat Plaquettaire 24
a. Méthodes pour la revue de la littérature 28
b. Culture cellulaire et lysat plaquettaire 31
c. Conception de biomatériaux contenant du lysat plaquettaire et résultats in vivo 37
d. Applications cliniques chez l'Homme du lysat plaquettaire 43
III. Discussion générale sur le recours aux lysats plaquettaires 47
IV. Références de la première partie 51
Deuxième partie : Conception d'un biomatériau à base de lysat plaquettaire par séchage au CO_2 supercritique **78**
I. Le CO_2 supercritique 79
1. Applications médicales 80
2. Fibrine et CO_2 supercritique 82
II. Mise au point du procédé de séchage et conception des biomatériaux 82
1. Constitution des hydrogels de lysat plaquettaire 82
2. Séchage des hydrogels au CO_2 supercritique 87
a. Substitution de la phase aqueuse par un solvant 89
b. Substitution du solvant par le CO_2 liquide 95
c. Séchage en atmosphère supercritique 97
III. Références de la deuxième partie 107
Troisième partie : Caractérisation des mousses sèches de lysat plaquettaire *in vitro* et *in vivo* **112**
I. Matériels et méthodes 113
1. Caractérisation de la structure interne du matériau 113
Microscopie électronique à Balayage 113
Analyse dispersive en énergie (EDX) et Analyse par Diffraction des Rayons X 114
Analyse spectroscopique FTIR 114

Analyse de la porosité par porosimétrie à mercure 115
2. Humidité résiduelle 115
Taux d'humidité résiduelle 116
Analyse Thermogravimétrique (ATG) 116
3. La cinétique d'hydratation et le taux d'imprégnation hydrique 116
4. Résistance mécanique : essais de compression 117
5. CO_2 supercritique et stérilisation 118
6. Suivi de la dégradation en milieu aqueux 123
Spectrométrie ultraviolet-visible (UV) 123
7. Propriétés biologiques : bioactivité et biocompatibilité 123
Cinétique de libération des facteurs de croissance en milieu aqueux 123
Biocompatibilité du matériau 125
8. Analyses statistiques 126
II. Résultats 127
1. Caractérisation de la structure interne du matériau 127
Microscopie Electronique à Balayage 127
Analyse EDX et analyses DRX 128
Analyse Spectroscopique FTIR 130
Analyse de la porosité 131
2. Humidité résiduelle 135
Taux d'humidité 135
Analyse Thermogravimétrique 136
3. Taux d'imprégnation hydrique 137
4. Résistance mécanique : essais de compression 138
5. CO_2 supercritique et stérilisation 139
6. Suivi de la dégradation en milieu aqueux 140
Spectrométrie ultraviolet-visible (UV) 140
7. Propriétés biologiques : bioactivité et biocompatibilité 141
Cinétique de libération des facteurs de croissance en milieu aqueux 141
Biocompatibilité du matériau 143
Implantations in vivo 145
III. Discussion 149
IV. Références de la Partie 3 156
Quatrième partie : Fonctionnalisation des mousses de lysat plaquettaire par incorporation de nouveaux éléments actifs 160
I. Enrichissement de la structure en éléments actifs 161
1. Précipitation de cristaux de phosphate de calcium 161

a. Précipitation par trempage dans une solution de Na_2HPO_4 162
b. Précipitation par incorporation directe de Na_2HPO_4 165
Protocole de la précipitation des cristaux 165
Influence sur la porosité des mousses 167
Influence sur les propriétés mécaniques 168
Précipitation dans les conditions Ca/P=1,16 en l'absence de NaCl 170
Caractérisation des cristaux précipités 172
2. Création de biomatériaux composites à base de mousses sèches de LP 176
a. Association à des phosphates de calcium pulvérulents 176
b. Association à des céramiques biphasiques HA/TCP poreuses 177
c. Perspective : fonctionnalisation des mousses par incorporation d'espèces ioniques actives 181
II. Discussion 185
III. Références de la quatrième partie 188
Cinquième partie : indications et cadre légal de l'utilisation clinique des mousses de lysat plaquettaire 193
I. Indications et futures applications de la mousse de lysat plaquettaire 194
1. Comme biomatériau utilisé en régénération tissulaire 194
Faut-il envisager une utilisation autologue ou allogénique ? 195
Un exemple de perspective d'application clinique : la régénération parodontale 197
2. Comme biomatériau support de thérapie cellulaire 198
3. Comme biomatériau support de culture cellulaire en laboratoire 199
II. Cadre légal de l'utilisation clinique des mousses de lysat plaquettaire 200
1. Les produits sanguins labiles 201
2. Les dispositifs médicaux 201
3. Les médicaments de thérapie innovante 204
III. Références de la Cinquième Partie 208
Conclusion générale 211
Table des Tableaux 214
Table des Figures 216
ANNEXE 1 : modalités de la procédure de recherche sur PubMed 222

Introduction générale

La régénération est un terme générique dérivé du latin « *regeneratio* », qui signifie « le retour à la vie », et aujourd'hui défini par le Larousse dans le domaine courant comme étant, d'un point de vue biologique, « la reconstitution des tissus organiques lésés chez les êtres vivants » [1]. Elle se distingue de la réparation tissulaire qui s'avère être un comblement cicatriciel sans restauration *ad integrum* de la structure des tissus initiaux. La complexité de la régénération fonctionnelle et structurelle repose sur la multitude de tissus différents qu'il faut parfois gérer en parallèle, chacun ayant des cellules avec des potentiels de prolifération et de différenciation propres. Si une compétition cellulaire a lieu, les plus rapides à coloniser le site de cicatrisation risquent d'occuper la place au lieu de respecter l'organisation telle qu'elle prévalait à l'origine. Le modèle sur lequel se base la recherche en régénération tissulaire pour contrer ces phénomènes est décrit comme étant l'embryon humain parce qu'il présente des capacités de croissance et de formation tissulaires très importantes, dans le respect de l'architecture la plus fonctionnelle [2]. Cela passe par l'action de multiples molécules, les plus connues étant regroupées sous le terme de « facteurs de croissance » qui influencent des cellules sur le site et à distance pour engendrer une réponse sécrétoire, proliférative, différenciatrice ou même motrice [3].

Si recréer le modèle embryonnaire représente l'objectif ultime de la régénération tissulaire, c'est entre autres parce que chez l'individu plus âgé, les mécanismes de reconstruction sont moins efficaces [4]. Ils peuvent même se trouver défaillants en cas de pathologies chroniques ou de vieillissement avancé en raison de l'entretien d'une inflammation chronique [5]. Les défauts de cicatrisation représentent un enjeu majeur en médecine car ils constituent une complication fréquente dans de nombreuses maladies, certaines présentant une prévalence importante. C'est le cas notamment du diabète dont une des complications est la micro-angiopathie diabétique, c'est-à-dire un défaut d'irrigation et de réparation des micro-vaisseaux

sanguins dans l'organisme, rendant compliqué l'afflux sanguin sur les sites de cicatrisation et conduisant à la chronicisation des plaies [6]. Mais les retards de cicatrisation peuvent toucher tous les tissus, mous et durs, et provenir de lésions d'origines variées : traumatisme, cancer, complication de pathologies générales, effets indésirables de médicaments…

Dans certaines conditions, la régénération tissulaire peut être rendue d'autant plus complexe que des contraintes mécaniques et microbiologiques peuvent entrer en jeu.

Les sollicitations mécaniques peuvent favoriser tout particulièrement la régénération du cartilage ou du tissu osseux qui doivent rester fonctionnels [7], mais s'ils sont soumis à des mouvements de trop grande ampleur et de force trop importante en permanence, l'effet devient néfaste et il faut alors stabiliser l'os le temps de la cicatrisation. A une plus petite échelle, il apparaît que de petites contraintes appliquées sur les cellules responsables de la cicatrisation ont des propriétés bénéfiques sur la stimulation de leur activité et de leur motilité surtout si leur matrice présente un caractère élastique [8]. Le compromis mécanique est difficile à trouver entre sollicitations suffisantes positives et sollicitations exagérées néfastes.

La présence de microorganismes est une problématique à gérer pour les praticiens qui travaillent sur l'ensemble des voies digestives par exemple. Pour le chirurgien-dentiste confronté au traitement de la parodontite, une pathologie inflammatoire d'origine infectieuse qui détruit les tissus de soutien des dents [9], les enjeux de la régénération de tous les tissus en compétition [10] doivent se concevoir en présence des bactéries présentes en bouche dont certaines sont particulièrement virulentes [11,12].

L'optimisation de la réussite des recherches menées dans le cadre de la régénération tissulaire au vu des contraintes et des impératifs détaillés ci-dessus passe par le développement de biomatériaux capables d'accueillir des cellules [2], que ce soit avant leur implantation ou par

colonisation une fois qu'ils sont implantés. En régénération osseuse par exemple, la liste des biomatériaux qualifiés de « substituts osseux » qui sont déjà disponibles sur le marché est très fournie [13,14] mais les résultats cliniques sont inconstants. Cela dépend notamment du métabolisme et de l'état de santé propre à chaque patient [13,15,16] mais également des caractéristiques propres à chaque matériau. Ils possèdent en effet tous leur propre porosité, une composition chimique particulière ou même une galénique différente qui influencent leur capacité à être colonisé par les cellules et les vaisseaux sanguins. La majorité de ces matériaux sont dépourvus de bioactivité, c'est-à-dire qu'ils ne servent que de support passif sur lequel les cellules de l'hôte peuvent adhérer et proliférer mais rien ne les encourage à initier une différenciation ou une activité de production de protéines particulière [17]. La fonctionnalisation de ces biomatériaux est ainsi indispensable, soit par leur association à des cellules, soit par leur association avec des molécules bioactives comme des facteurs de croissance ou des ions bioactifs capables de stimuler l'activité des cellules responsables de la régénération. La réussite d'un tel processus sera encore renforcée si le biomatériau créé peut être utilisé pour la régénération de plusieurs tissus différents. Cela lui confèrera des indications dans le cadre de pathologies variées, affectant plusieurs types de tissus.

L'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit est ainsi de développer un biomatériau d'origine biologique, à base de lysat plaquettaire, qui réponde aux critères déjà énoncés ainsi qu'au cahier des charges des structures optimisées pour la régénération tissulaire. La suite du manuscrit s'organise autour de cinq parties :

1) un état de l'art sur le sujet dans la littérature,

2) le protocole de conception du biomatériau,

3) sa caractérisation *in vitro* et *in vivo*,

4) les modifications qui peuvent lui être apportées pour optimiser ses performances

5) enfin le cadre légal et règlementaire de son utilisation future.

Références de l'Introduction

[1] Larousse É, editor. Régénération. Dict Fr Larousse 2019.

[2] Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. Nat Mater 2009;8:457–70. https://doi.org/10.1038/nmat2441.

[3] Zarei F, Soleimaninejad M. Role of growth factors and biomaterials in wound healing. Artif Cells Nanomedicine Biotechnol 2018;46:906–11. https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1439836.

[4] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. Sci Transl Med 2014;6:265sr6-265sr6. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337.

[5] Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R. Effects of Aging on Fracture Healing. Curr Osteoporos Rep 2017;15:601–8. https://doi.org/10.1007/s11914-017-0413-9.

[6] Ali MK, Siegel KR, Chandrasekar E, Tandon N, Montoya PA, Mbanya J-C, et al. Diabetes: An Update on the Pandemic and Potential Solutions. In: Prabhakaran D, Anand S, Gaziano TA, Mbanya J-C, Wu Y, Nugent R, editors. Cardiovasc. Respir. Relat. Disord. 3rd ed., Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2017.

[7] Gross TS, Poliachik SL, Prasad J, Bain SD. The effect of muscle dysfunction on bone mass and morphology. J Musculoskelet Neuronal Interact 2010;10:25–34.

[8] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell 2006;126:677–89. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044.

[9] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Nat Rev Dis Primer 2017;3:17038. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38.

[10] Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J Clin Periodontol 1984;11:494–503.

[11] Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979;6:278–307.

[12] Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol 2014;35:3–11. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001.

[13] Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers. Biomatter 2012;2:271–7. https://doi.org/10.4161/biom.22948.

[14] Jordana F, Le Visage C, Weiss P. [Bone substitutes]. Med Sci MS 2017;33:60–5. https://doi.org/10.1051/medsci/20173301010.

[15] Sculean A, Nikolidakis D, Nikou G, Ivanovic A, Chapple ILC, Stavropoulos A. Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. Periodontol 2000 2015;68:182–216. https://doi.org/10.1111/prd.12086.

[16] Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. Periodontol 2000 1999;19:74–86.

[17] Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V. Les Substituts Osseux en Odontologie. Partie 2 - Classification. BioMatériaux Clin 2019;4.

Première partie : Du phénomène de coagulation aux dérivés plaquettaires

Les thrombocytes, ou plaquettes, sont des cellules dépourvues de noyau, formées suite à la fragmentation dans la moelle osseuse de cellules appelées mégacaryocytes [1]. Leur cytoplasme est riche en protéines comme le fibrinogène (capable d'être assemblé en polymères de fibrine), ou encore de nombreux facteurs de croissances détaillés plus bas. Elles ont pour rôle principal de participer aux phénomènes de la coagulation sanguine dont les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires sont complexes et mènent à la réparation voire à la régénération du tissu.

I. Principes généraux de la coagulation sanguine

Les processus complets de l'hémostase et de la coagulation aboutissent à la formation et à la stabilisation d'un caillot de fibrine [2,3] après que différents mécanismes de clivages aient conduit à la transformation de molécules de fibrinogène en monomères de fibrine [4–6]. En cas de blessure, les plaquettes sont activées, ce qui entraine la libération de molécules trophiques participant à la stimulation d'événements physiologiques complexes menant à la réparation et à la régénération des tissus.

De façon simple, les phénomènes sont initiés lors de la création d'une brèche vasculaire car le flux sanguin se retrouve au contact du sous-endothélium. Les plaquettes en circulation se fixent aux fibres de collagène exposées car elles présentent des récepteurs glycoprotéiques spécifiques pour ces fibres et les liens créés sont renforcés par la fixation du facteur de Von Willebrand préalablement libéré par les plaquettes et les cellules endothéliales [7]. Les thrombocytes ainsi fixés sont activés et prennent une forme plus étoilée [8].

Cette activation conduit à une dégranulation des plaquettes dont le contenu est libéré dans le plasma. Parmi les molécules ainsi libérées se trouvent notamment le facteur d'activation

plaquettaire et le facteur de Von Willebrand qui vont entrainer une adhésion et une activation en cascade de davantage de cellules, mais également le facteur IV de la coagulation qui n'est autre que le calcium. Celui-ci va participer à l'activation de multiples autres facteurs de la coagulation détaillés plus loin.

Une protéine nommée Facteur Tissulaire (FT), exprimée à la surface de cellules comme les fibroblastes et les leucocytes (appelées en l'occurrence cellules porteuses du Facteur Tissulaire), va former un complexe avec le facteur VIIa (« a » pour « activé »). L'ensemble se lie avec le facteur plaquettaire XIa, préalablement activé si du calcium avait bien été libéré par le processus décrit précédemment. Ce complexe active, toujours sous l'influence du calcium, les facteurs IX et X (facteur de Stuart) présents sur les membranes cellulaires [9–13]. Le facteur X activé (Xa) se lie au facteur Va (activé par ailleurs), ce qui forme le complexe appelé pro-thrombinase responsable en présence de calcium de l'activation du facteur II (la prothrombine). La molécule IIa nouvellement formée correspond à la thrombine, dont le rôle est entre autres d'assurer la conversion du fibrinogène en fibrine selon plusieurs mécanismes en chaîne de clivages [4–6].

Le fibrinogène est une molécule soluble de dimensions 450 Ångström et de poids 350kDa qui est composée d'une paire de trois polypeptides Aα, Bβ et γ. Ils sont assemblés entre eux par leurs extrémités N-terminales [4] et par l'existence de vingt-neuf ponts disulfures [14]. Les extrémités C-terminales des chaines Aα sont localisées au cœur de la molécule, alors que celles des chaines Bβ et γ sont davantage orientées vers l'extérieur [4]. La thrombine intervient en clivant les extrémités N-terminales des chaines Aα et Bβ [15]. Cela aboutit à la formation de monomères de fibrine et de courts peptides appelés fibrinopeptides A et B (FPA, FPB), le premier étant clivé plus rapidement que le second par la thrombine [15]. De nouveaux liens peuvent alors être créés entre les extrémités N-terminales nouvellement apparues sur les chaines Aα et Bβ et les séquences voisines des autres polymères [14,15]. Les

extrémités des chaines Aα se lient à une séquence des chaines γ et celles des chaines Bβ se connectent à une autre séquence sur Bβ mais appartenant à une chaine différente [4] : c'est là la formation du polymère de fibrine.

La thrombine active également le facteur XIII qui devient une enzyme du type transglutaminase capable de créer des liaisons covalentes entre les chaines γ et divers monomères, entre les chaines Aα de plusieurs monomères et de lier le caillot à des protéines du sous-endothélium. L'activation de cette enzyme est très dépendante de la présence de calcium dont le rôle est majeur dans la formation des complexes de coagulation et la génération de thrombine [16].

L'ensemble des mécanismes impliqués dans le processus de coagulation et que nous avons résumé ci-dessus aboutit *in fine* à la stabilisation d'un caillot [2], [12]. Un bref schéma des voies aboutissant à la formation des polymères de fibrine est présenté dans la Figure 1.

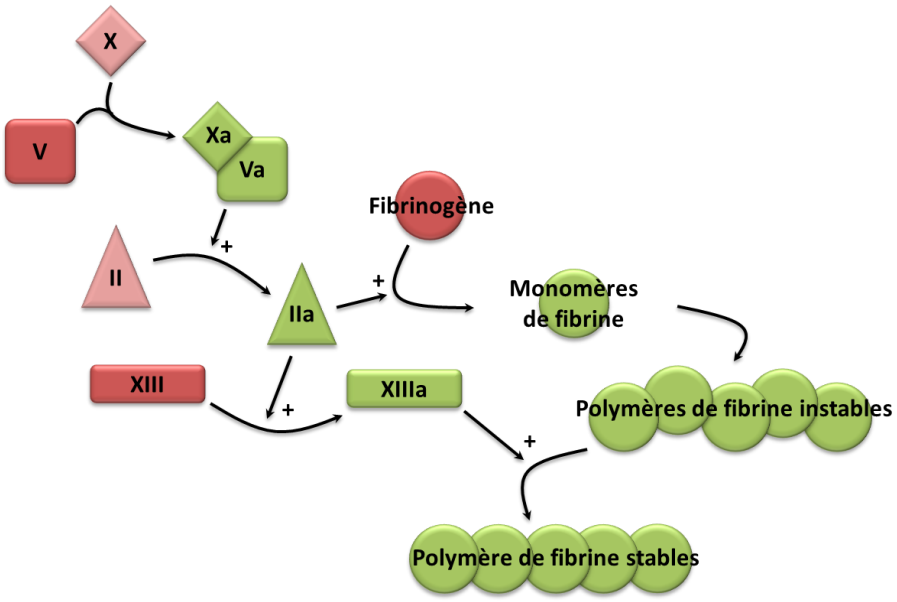

Figure 1 : Représentation schématique d'une partie de la cascade de coagulation qui aboutit à la stabilisation du caillot de fibrine [2]. La pro-accélérine, appelée aussi facteur labile ou facteur V, se lie au facteur Xa lorsqu'elle est activée pour former un complexe dont le rôle est de favoriser, en présence de calcium, la formation de thrombine (facteur IIa) à partir de pro-thrombine (facteur II). C'est cette thrombine qui joue un double rôle dans la formation du caillot de fibrine en permettant d'une part la transformation des molécules de fibrinogène en monomères de fibrine, et d'autre part l'activation du facteur stabilisant les polymères de fibrine : le facteur XIIIa. Ce dernier, dont le nom parle de lui-même, permet la stabilisation des polymères de fibrine

La compréhension de la cascade de coagulation sanguine et du rôle des plaquettes menant à la régénération tissulaire après un traumatisme permet de mieux comprendre l'action thérapeutique des produits appelés concentrés/dérivés plaquettaires. Il s'agit en effet de différentes fractions sanguines obtenues à partir de prélèvements sanguins humains et qui contiennent tout ou partie du plasma, du sérum et des fractions plaquettaires [17]. La différence entre le plasma et le sérum est leur contenu en protéines de la coagulation. Le plasma est préparé par centrifugation du sang dans des tubes contenant des anticoagulants alors que les tubes utilisés pour la préparation du sérum n'en contiennent pas et un caillot se forme donc durant la centrifugation. De nos jours il existe de nombreuses techniques de préparations des concentrés plaquettaires (CP) [17] car plusieurs institutions ont conçu leurs propres protocoles permettant d'obtenir des résultats reproductibles [18–20]. En réalité la première procédure développée datait du début des années 1970 [21] mais les principales évolutions concernant les méthodes de préparation et les applications des CP datent plutôt de la fin des années 1990 [22].

II. Les principaux Concentrés Plaquettaires

1. Le Plasma Riche en Plaquettes (PRP)

Le PRP, comme la plupart des autres CP, contient les plaquettes de l'échantillon prélevé et une partie de ses globules blancs [23]. Il contient en moyenne 3 à 5 fois plus de plaquettes et de facteurs de croissance que le sang périphérique [24]. Il s'agit d'un plasma liquide qui est dérivé du sang prélevé dans des tubes enrichis en anticoagulants (tubes citratés, à EDTA, héparinés…) et isolé selon un protocole de centrifugation en deux étapes (Tableau 1, Figures 2 et 3). La première centrifugation se fait à basse vitesse (200 g, 7 min) afin d'obtenir un

surnageant plasmatique pauvre en cellules, une phase intermédiaire riche en éléments cellulaires et une phase inférieure de globules rouges. Ensuite, la deuxième centrifugation, plus rapide (2000g, 10min), est menée sur le surnageant plasmatique et la phase intermédiaire riche en cellules. Elle permet d'isoler un caillot inférieur de globules rouges résiduels et deux autres phases : le plasma pauvre en plaquettes (PPP) en haut et le plasma riche en plaquettes (PRP) au milieu [23]. Le PPP est pauvre en éléments permettant d'envisager son utilisation en régénération tissulaire [17], en revanche le PRP possède lui des propriétés bioactives importantes. Utilisé en chirurgie, le PRP peut libérer rapidement les facteurs de croissance au niveau du site d'implantation, et ce pendant une durée pouvant aller jusqu'à 24 heures (le temps que les membranes cellulaires soient détruites) [25].

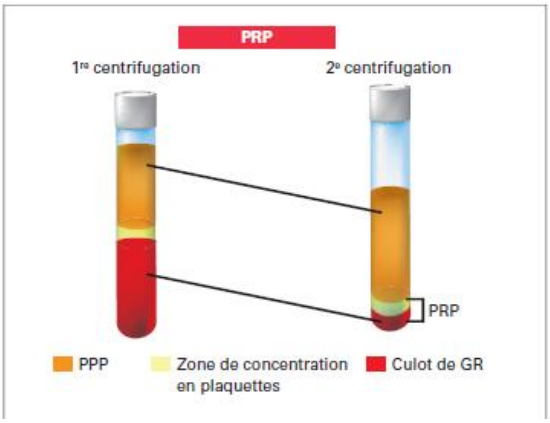

Figure 2 : Technique de préparation du PRP [26]. L'abréviation PPP signifie « Plasma Pauvre en Plaquettes » et GR signifie « Globules Rouges ».



Figure 3 : Obtention du PRP en bloc opératoire (reproduit de [27]).

Selon que son contenu est épuré des globules blancs ou pas il sera appelé P-PRP (*Pure-PRP*) ou L-PRP (*Leucocytes-PRP*) [23]. Pour aller plus loin dans l'utilisation du PRP et modifier sa consistance jusqu'alors liquide, une dernière étape consistant à activer la gélification de la préparation peut être menée (Figure 4). L'addition de chlorure de calcium ou de thrombine permet en effet de lancer la cascade de coagulation (le calcium et la thrombine étant, comme détaillé précédemment, deux éléments clés de la formation du caillot de fibrine chez l'Homme). Par exemple, la thrombine permet la transformation du fibrinogène en un réseau de fibrine qui possède des propriétés hémostatiques et adhésives et entraine la gélification du composé. Le procédé d'utilisation de la thrombine a déjà mené à la production d'un matériau qui est aujourd'hui commercialisé (notamment sous la marque TISSUCOL®, traitement sous forme de poudre de fibrinogène et de facteurs de la coagulation à reconstituer et destiné à favoriser l'hémostase locale).

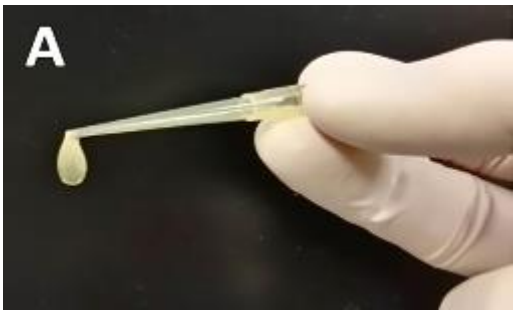

Figure 4 : PRP gélifié par ajout de $CaCl_2$ (reproduit de [28]).

2. Le Plasma Riche en Facteurs de Croissance (PRGF)

C'est une méthode plus simple de préparation de PRP. Une centrifugation de l'échantillon sanguin pendant 8 minutes à 770 g dans un contenant enrichi en anticoagulant permet d'isoler cinq phases différentes. On retrouve de haut en bas (Figure 5) :

- le plasma pauvre en facteurs de croissance (*Plasma Poor in Growth Factors* PPGF),
- le plasma contenant des facteurs de croissance (*Plasma with Growth Factors* PGF),
- le plasma riche en facteurs de croissance (*Plasma Rich in Growth Factors* PRGF),
- le plasma très riche en facteurs de croissance (*Plasma Very Rich in Growth Factors* PVRGF)

Contrairement à ce que son nom pourrait laisser croire, le PRGF à lui seul ne contient pas une quantité très importante de facteurs de croissance (environ 1ng/mL de PDGF contre 8 dans le PRP et moins de 100pg/mL de VEGF contre 500 dans le PRP d'après les dosages publiés par Masuki et *al*. [29]). La particularité de ces phases est en réalité de constituer un gradient de concentration en plaquettes et en facteurs de croissance. A la différence du PRP elles ne contiennent pas ou presque pas de globules blancs (moins de 500/µL pour le PRGF contre plus de 30 000/µL pour le PRP [30,31]).

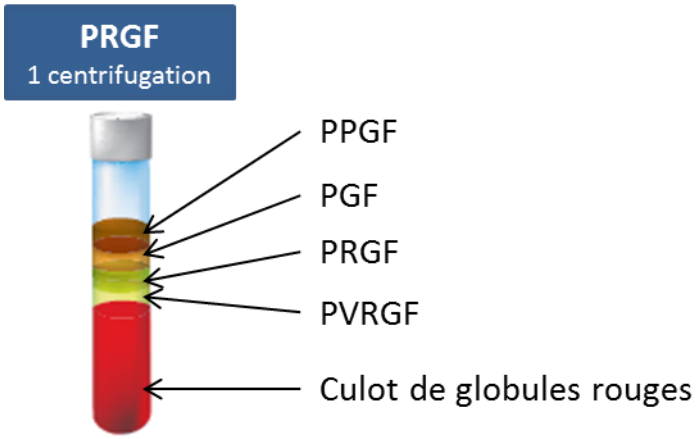

Figure 5 : Méthode de préparation du PRGF [26].

Les quatre premières phases représentent la totalité du plasma ; seules les trois phases PGF, PRGF et PVRGF sont prélevées à l'aide d'une pipette car elles revêtent un intérêt majeur en ce qui concerne la disponibilité des facteurs de croissance. Elles ont déjà été utilisées en chirurgie, notamment orale, pour favoriser la cicatrisation des tissus durs et des tissus mous après une intervention [32]. Une fois recueillies, du chlorure de calcium peut être ajouté à ces phases pour obtenir, en quelques minutes, un gel prêt à être utilisé [32] (Figure 6).

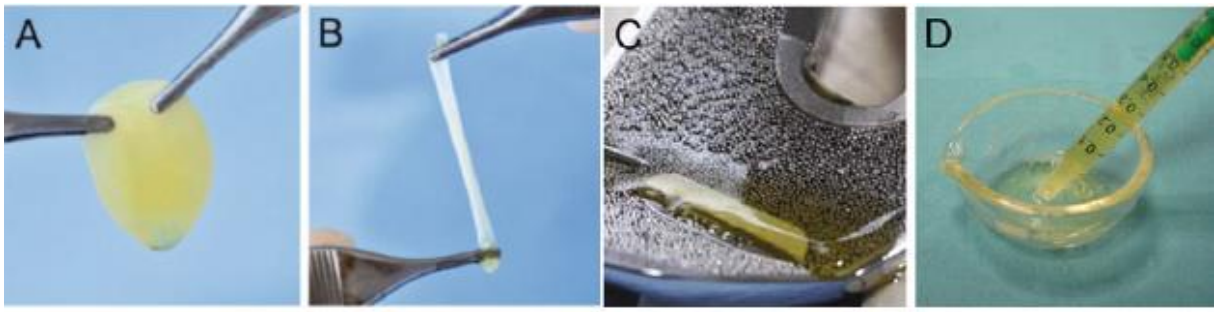

Figure 6 : Différents aspects du PRGF selon qu'il est gélifié par ajout de chlorure de calcium (A, B, C) ou liquide (D) (reproduit de [30]).

3. Le Plasma Riche en Fibrine (PRF) et ses déclinaisons

Le PRF (également appelé *L-PRF* pour *Leucocytes-Plasma Riche en Fibrine*) est un caillot de fibrine formé en l'absence d'anticoagulant lors du protocole de centrifugation [33]. Il représente aujourd'hui le concentré de choix en chirurgie. Un seul passage dans la centrifugeuse est nécessaire pour sa préparation (2000 g, 10min) immédiatement après le prélèvement sanguin [33,34]. Le caillot de PRF se forme au milieu du tube entre les phases de PPP et de globules rouges [33] (Figure 7).

La fibrine extracellulaire naturellement présente dans le sang a polymérisé pour créer un réseau tridimensionnel de fibres, servant de guide à l'angiogenèse et donc à la régénération tissulaire (Figure 8). La matrice de fibrine va libérer progressivement les plaquettes, les leucocytes et les facteurs de croissance. Le taux est maintenu constant pendant environ 10 jours [35]. Le PRF est utilisé sous forme de caillot ou de membrane. La méthode a progressivement été préférée à celle du PRP en chirurgie orale pour des raisons évidentes de simplification du protocole et de la manipulation [22]. Le PRF possède également les propriétés bénéfiques favorisant l'angiogenèse, la prolifération, la différenciation ou la migration cellulaire [22]. Les contenus du PRF et du PRP sont de fait très similaires et la principale différence entre eux est leur consistance. Leurs indications sont également assez similaires, du comblement osseux [36] à la gestion des tissus mous [22]. En odontologie, chez des patients souffrant de retard de cicatrisation potentiel ou avéré, une membrane peut être appliquée par-dessus la lésion osseuse pour aider à stabiliser le caillot, favoriser le maintien d'un greffon et limiter l'exposition du site chirurgical au milieu buccal. Cette membrane peut être réalisée en PRF en positionnant un des caillots de fibrine obtenus entre deux plaques de verre pour le réduire en un film plus fin. La résistance et les propriétés mécaniques de ces membranes sont toutefois inférieures à celles de membranes résorbables disponibles sur le

marché (manque de rigidité, dégradation trop rapide) [37]. En revanche, sous forme de caillot, le PRF a des propriétés mécaniques plus intéressantes et sa résorption est plus lente et similaire à celle d'un caillot sanguin [35].

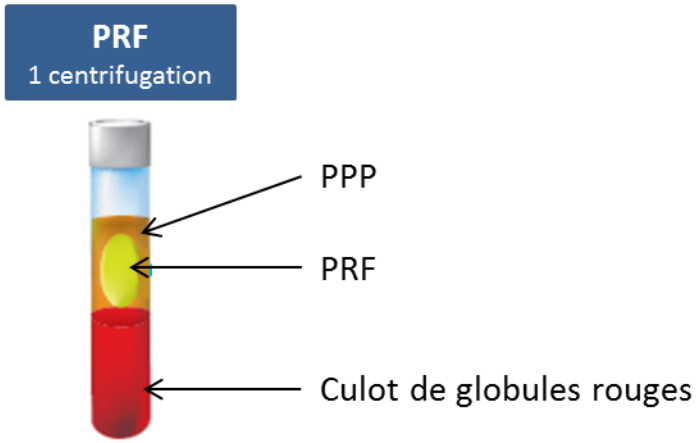

Figure 7 : Technique d'obtention du PRF [26]. Il est à noter que la procédure est réalisée dans un tube dépourvu d'anticoagulant.



Figure 8 : Photographie de trois caillots de PRF obtenus au cours d'une intervention de chirurgie orale après prélèvements sanguins chez une patiente puis centrifugation (iconographie personnelle).

Depuis le développement du protocole de constitution du PRF, certaines adaptations ont été proposées pour élargir la gamme des PRF disponibles, avec comme principales modifications des changements au niveau de la vitesse et du temps de centrifugation. Si l'échantillon

sanguin est centrifugé à très faible vitesse et pendant un laps de temps très court (110 g, 3 min), le caillot de fibrine n'a pas complètement le temps de se former et la phase récupérée au centre du tube devient injectable : on parle de PRF injectable (ou I-PRF) [38]. Si la centrifugation est légèrement plus rapide (500 g, 10 minutes), le caillot commence à se former. Il est plus petit que celui du PRF conventionnel mais englobe davantage de globules blancs : c'est le A-PRF (*Advanced-PRF*) [29,38]. Enfin, une centrifugation encore plus rapide mais brève (1400 g, 4 min) permet de générer un concentré de facteurs de croissance appelé CGF (*Concentrated Growth Factors*) qui appartient aussi à la famille des PRF [29].

4. L'isolation plaquettaire par la technique du *Buffy Coat*

La méthode du *Buffy Coat* représente davantage une technique de préparation et d'isolation des plaquettes qu'un dérivé en tant que tel (Figure 9). Une première centrifugation à haute vitesse et en présence d'anticoagulant permet l'obtention de trois phases : un culot de globules rouges, une phase intermédiaire contenant les plaquettes et les globules blancs (phase appelée *Buffy Coat*) et une phase de PPP en haut [39]. Après isolation de la couche intermédiaire, une centrifugation à plus faible vitesse est appliquée pour isoler les plaquettes [39]. Une étape de déleucocytation par filtration peut être entreprise sur le concentré final pour terminer d'éliminer toute trace de globules blancs avant l'utilisation en biomédecine car le taux de globules blancs résiduels est plus important avec la technique du *Buffy Coat* qu'avec celle du PRP par exemple [17]. Grâce à la filtration, ainsi qu'à d'autres mécanismes qui peuvent être mis en place comme l'irradiation, il est aussi possible de s'assurer que le dérivé plaquettaire ne contienne plus d'agent pathogène qui aurait pu le coloniser [40].

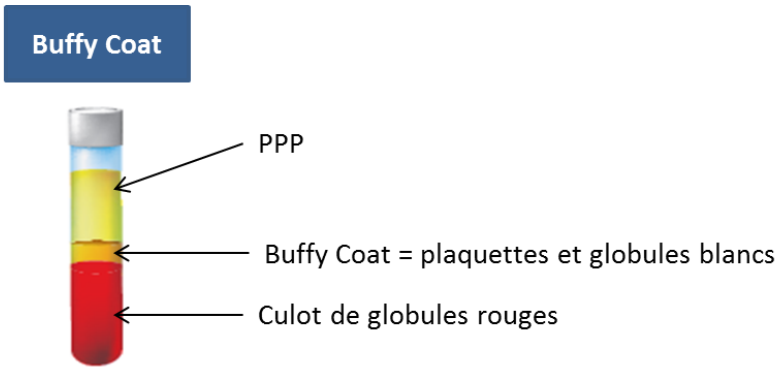

Figure 9 : Technique de préparation dite du *Buffy Coat* [26].

Les méthodes de préparation des différents concentrés plaquettaires sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Protocoles de préparation des principaux concentrés plaquettaires

	Anticoagulant	Force de centrifugation (g)	Temps (min)
PRP	Oui	1) 200 2) 2000	1) 7 2) 10
PRGF	Oui	770	8
L-PRF	Non	2000	10
A-PRF	Non	500	10
I-PRF	Non	110	3
CGF	Non	1400	4

5. Le Lysat Plaquettaire

Le terme de lysat plaquettaire (LP) fait référence au contenu du cytoplasme des plaquettes qui se trouve libéré dans le milieu quand la membrane plasmique est détruite. Il s'agit donc d'un dérivé plaquettaire (DP) plus que d'un concentré plaquettaire au sens propre du terme dans la mesure où les plaquettes sont détruites.

Il est obtenu à partir des CP précédemment décrits. Pour générer du lysat plaquettaire, différentes méthodes existent : une supplémentation en thrombine pour initier la dégranulation des thrombocytes, des cycles d'ultrasons ou des congélations-décongélations successives pour lyser les membranes cellulaires [17]. Aucune séparation n'est nécessaire avant l'utilisation du lysat, même si une nouvelle centrifugation (220 g, 10 min) est possible pour éliminer les débris cellulaires [41].

Le contenu du cytoplasme, c'est-à-dire les facteurs de croissance, les molécules de fibrinogène, les cytokines, les autres protéines et les ions, est libéré et directement accessible. En moyenne, la concentration totale en protéine dans le LP est comprise entre 52 et 60mg/mL [42]. Le calcium, primordial dans les phénomènes de coagulation décrits plus haut, est retrouvé à une concentration d'environ 7,92mg/dL [42].

Le fibrinogène, déjà retrouvé dans les concentrés plaquettaires avant la lyse des thrombocytes, peut voir sa concentration atteindre 3mg/mL, car une importante quantité était enfermée dans les cellules [17]. Les facteurs de croissance sont également libérés après la destruction des cellules et de hautes concentrations par exemple de VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*), de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), d'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou encore de TGF-β (*Transforming Growth Factor-beta*) vont être retrouvées [23] (Figure 10).

- Le VEGF est une protéine notamment impliquée dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales [43]. Elle stimule aussi la perméabilité des micro-vaisseaux et semble enfin impliquée dans la migration des monocytes-macrophages [44].

- Le PDGF est lui aussi impliqué dans la croissance et la prolifération cellulaire au cours de l'angiogenèse, la formation des structures de la peau ou même le développement rénal [45,46].
- L'EGF promeut la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire durant la formation du système nerveux, du système cardiovasculaire ou encore des épithéliums [47].
- Le TGF-β est classé parmi les cytokines et trouve une implication majeure à la fois dans la résolution de l'inflammation et dans la croissance tissulaire [48,49].
- Le FGF-2 (pour *Fibroblast Growth Factor-2*) appartient à la grande famille des 23 FGF identifiés. Il agit en favorisant la prolifération, la migration et l'activité de synthèse de protéines de la matrice extracellulaire par les cellules cibles [50].
- L'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) est, comme son nom l'indique, un facteur de croissance de structure semblable à celle de l'insuline. Il est en effet constitué de 4 domaines dont deux similaires à ceux de l'insuline. Il est impliqué principalement dans le développement des cartilages de conjugaison au niveau des os longs en stimulant la prolifération des chrondrocytes [51]. L'apparition de retards du développement mental et moteur chez des patients déficients en IGF-1 laisse apparaître en réalité son implication dans la croissance de davantage de tissus.

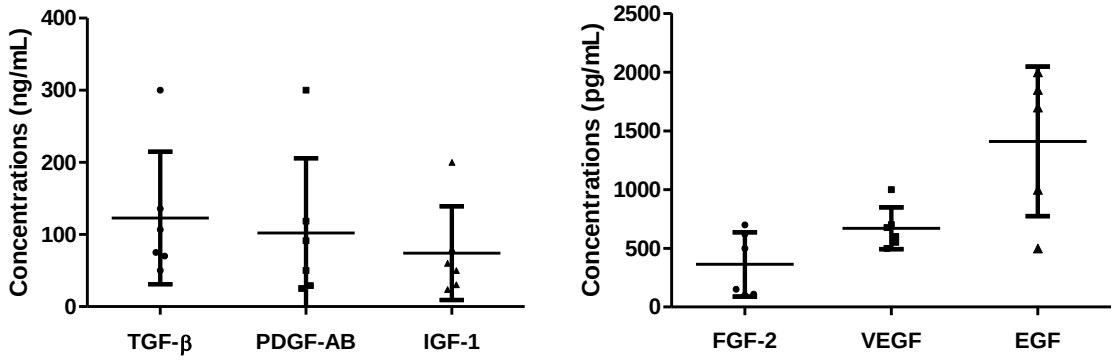

Figure 10 : Concentrations moyennes des 6 principaux facteurs de croissance retrouvés dans les lysats plaquettaires (TGF-β, PDGF, IGF-1, FGF-2, VEGF et EGF) et calculées d'après les dosages rapportés dans la littérature [17,52–55].

Les rôles de ces molécules, notamment impliquées dans la formation des tissus et des organes, constituent un argument supplémentaire en faveur de l'utilisation biomédicale des lysats plaquettaires dans le domaine de la régénération tissulaire. L'enjeu majeur est d'obtenir un produit dérivé du sang qui puisse être utilisé en toute sécurité, disponible en quantité suffisante et dont le contenu en protéines soit reproductible selon les pools de donneurs [33,56]. En effet, pour optimiser les qualités de ces DP, les fractions plaquettaires de différents individus sont regroupées. L'Etablissement Français du Sang (EFS) rassemble les prélèvements issus de 5 donneurs différents ; ce sont ceux de 100 donneurs qui sont rassemblés en Allemagne (il existe en Allemagne deux systèmes en parallèle qui gèrent les prélèvement sanguins : celui gouvernemental et celui de la Croix-Rouge [57], et qui fournissent les sociétés détaillées plus loin comme MacoPharma (France) ou PL Biosciences (Allemagne)).

Au vu des propriétés prometteuses des lysats plaquettaires, nous avons entrepris de réaliser une revue de la littérature pour référencer les études déjà publiées et ayant eu recours, en laboratoire ou en clinique, à du LP. Leur méthodologie, l'intérêt d'utiliser du lysat et les domaines d'application ciblés feront l'objet d'une synthèse.

a. Méthodes pour la revue de la littérature sur les applications biomédicales des lysats plaquettaires

L'intérêt porté aux lysats plaquettaires ne cesse de croître au cours du temps, comme en témoigne le nombre d'études publiées sur le sujet (Figure 11). Une procédure de recherche avancée sur PubMed pour référencer le recours aux LP dans les publications scientifiques biomédicales a été menée le 30 mars 2020 (Annexe 1). Les études pouvaient être incluses s'il s'agissait :

- D'études *in vitro* dans lesquelles le LP était utilisé en tant qu'adjuvant à des milieux de culture cellulaire ;
- D'études *in vitro* dans lesquelles le LP était utilisé seul ou en association avec d'autres biomatériaux pour la conception de biomatériaux destinés à une utilisation biomédicale ;
- D'essais *in vivo* chez l'animal dans lesquels le LP était utilisé seul ou en association avec d'autres biomatériaux et/ou des éléments cellulaires pour une utilisation biomédicale ;
- D'études cliniques chez l'Homme quel qu'en soit leur type (case report, étude observationnelle – transversale, prospective ou rétrospective –, essai clinique…) dans lesquelles le LP était utilisé seul ou en association avec d'autres biomatériaux et/ou des éléments cellulaires pour une utilisation biomédicale.

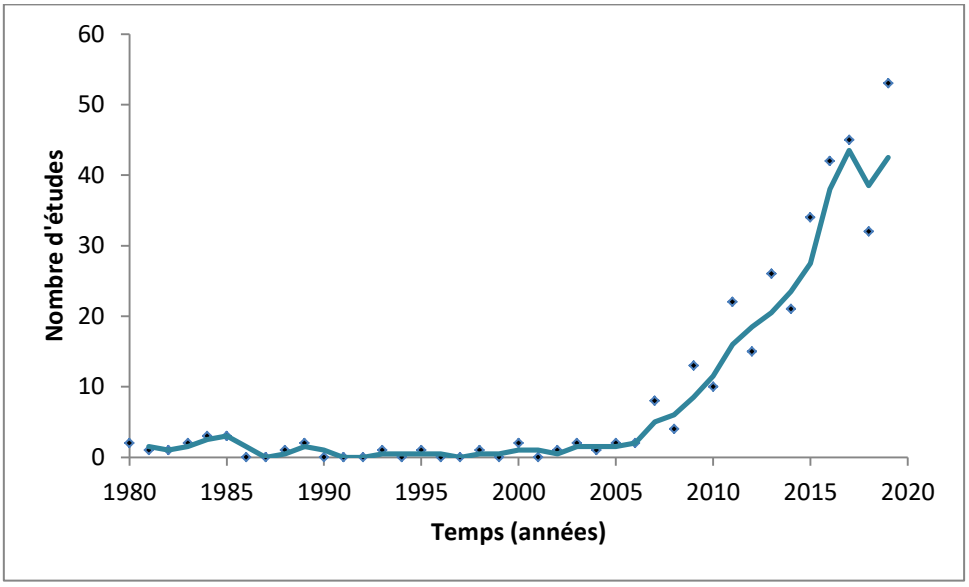

Figure 11 : Evolution dans le temps du nombre d'études référencées sur PubMed dans lesquelles du lysat plaquettaire est utilisé. Les publications ont été identifiées grâce à une procédure de recherche avancée menée le 30 mars 2020 sur le moteur de recherche. L'année 2020 (n = 18), représentée par ses trois premiers mois seulement, a été masquée du graphe.

La majorité des équipes de recherches (91%) ont recours à des lysats plaquettaires d'origine humaine (Figure 12). Toutefois, d'autres origines peuvent être envisagées. Ainsi 4% des études mises en évidence utilisent du LP d'origine équine [58–60], 2% du LP de rat [61], 1% du LP canin [62], ou encore moins de 1% d'entre elles du LP bovin [63], porcin [64], de lapin [65,66], ou de mouton [67]. L'intérêt de recourir à des lysats humains est de préparer le cadre règlementaire à de futurs essais cliniques dans lesquels le LP humain serait le seul toléré par les comités d'éthique.

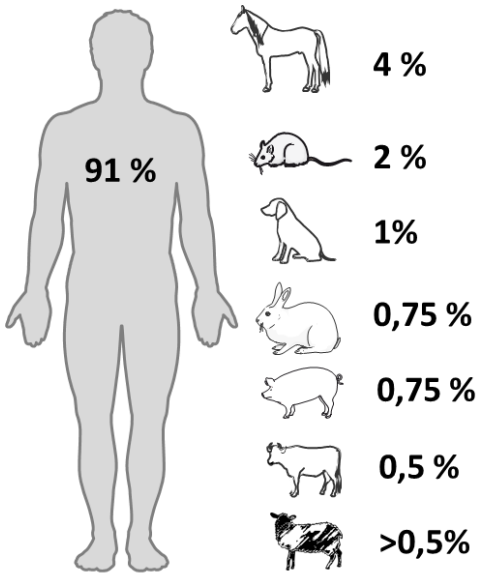

Figure 12 : Infographie présentant les origines des lysats plaquettaires utilisés dans les études expérimentales, pré-cliniques et cliniques (371 études au total). Tous les types d'utilisation du LP ont été retenus (comme adjuvant pour milieu de culture cellulaire, comme composant de biomatériaux synthétisés *in vitro* et éventuellement implantés *in vivo* chez l'animal, ou même en régénération tissulaire chez l'Homme).

Les publications relevées au cours de l'analyse seront classées dans la suite de ce travail dans trois grandes catégories selon que les lysats plaquettaires aient été utilisés en tant qu'adjuvants pour milieu de culture cellulaire, en application (directe ou associés à des biomatériaux) *in vivo* chez l'animal ou cliniquement chez l'Homme.

b. Culture cellulaire et lysat plaquettaire

La culture cellulaire consiste à maintenir des cellules humaines ou animales dans un milieu riche en facteurs de croissance et en nutriments de façon à ce qu'elles puissent survivre, proliférer, se multiplier et éventuellement se différencier. Parmi les milieux de culture disponibles, trois types différents existent : les milieux contenant du sérum, les milieux pauvres en sérum et les milieux dépourvus de sérum [68].

- Les premiers contiennent habituellement 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) [68], élément communément utilisé pour la culture cellulaire car il est largement disponible et qu'il contient un taux important de protéines, notamment l'albumine [69]. Un tel produit (ou ses assimilés comme le sérum bovin par exemple) peut être utilisé pour les études *in vitro* et précliniques, éventuellement pour les essais de phase I mais ne peut pas être utilisé dans des stades plus avancés d'essais cliniques [69].
- Les milieux pauvres en sérum comme le milieu de croissance endothéliale (Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2)) contiennent moins de 5% de SVF [68,70].
- Les milieux dépourvus de sérum sont détaillés ci-après.

Les tendances actuelles en biomédecine tendent plutôt à favoriser les produits humains – autologues ou allogéniques – et à limiter le recours à des produits xénogènes à cause du possible risque de transmission d'agents pathogènes [71]. Ainsi, les milieux dépourvus de sérum représentent une solution intéressante. Ils nécessitent cependant un apport exogène en facteurs de croissance car ils n'en contiennent pas non plus [72]. C'est là l'intérêt du recours aux lysats plaquettaires en tant qu'adjuvants pour milieux de culture puisque les LP sont naturellement riches en facteurs de croissance d'origine humaine. Les premières études décrivant une telle utilisation remontent aux années 1980 [73,74] ; elle est devenue depuis une pratique courante [69,75]. Il est à noter qu'en cas de recours à du lysat dans le milieu de

culture, celui-ci devra également être enrichi en anticoagulants comme l'héparine [76] afin d'éviter tout phénomène de coagulation dans les plaques de culture du fait de la polymérisation des molécules de fibrinogène en un réseau final de fibrine [77,78]. Une concentration minimale de 0,61 UI/mL pour de l'héparine non-fractionnée (ou de 0,024 mg/mL pour de l'héparine de bas poids moléculaire) est nécessaire pour inhiber la polymérisation spontanée du lysat plaquettaire dans le milieu. Cependant il est difficile d'augmenter les doses car cela influence négativement la prolifération des cellules cultivées dans le milieu, notamment les CSM (cellules stromales mésenchymateuses) [79]. L'ajout d'antibiotiques au milieu de culture, comme c'est le cas lors de l'utilisation de sérum de veau fœtal, est inévitable parce que le LP seul ne présente pas de propriétés antibactériennes suffisantes pour protéger la culture cellulaire [80].

Les compositions courantes des milieux de culture ainsi retrouvées dans la littérature sont résumées plus bas dans le Tableau 2. Il est à noter que l'ajout d'héparine au milieu de culture pour éviter la polymérisation de fibres de fibrine, pourtant recommandé par les entreprises commercialisant des lysats plaquettaires et plusieurs publications, n'est pas systématique.

Connaissant ces propriétés, plusieurs études ont été menées sur l'utilisation des LP pour la culture notamment de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) isolées à partir de plusieurs tissus humains (moelle osseuse [81,82], cordon ombilical [83,84], tissu adipeux [85–87], pulpe dentaire [88], muscle [89], liquide amniotique [90]…) et qui constituent une source prometteuse de progrès en médecine régénérative [91,92]. Les résultats démontrent clairement que les lysats plaquettaires adjoints aux milieux de culture favorisent l'activité métabolique de ces cellules, favorisent leur prolifération [81,93,94] et leur permettent de conserver leur potentiel de différenciation [78,95–99] sans créer d'aberrations chromosomiques [100,101]. Des essais de différenciation ont justement été entrepris avec

succès vers les lignées chondrocytaires [102], tendineuses [103], osseuses [104,105], adipeuses [106] ou encore musculaires [106] pour diverses CSM cultivées en milieu enrichi de lysat plaquettaire. La senescence des CSM issues du tissu adipeux s'avère réduite lorsque celles-ci sont cultivées en présence de LP plutôt que de SVF [107] et de telles conditions de culture peuvent mener certaines de ces cellules à sortir de leur état de quiescence [108].
L'ensemble de ces résultats encourageants ont été obtenus en cultures sur plaques mais sont également confirmés lorsque les cultures sont réalisées en trois dimensions. Le LP peut en effet être adjoint au milieu pour des cellules mises en culture sur diverses matrices à base par exemple de collagène [109], d'acide hyaluronique [110], de PLGA (pour *poly(lactic-co-glycolic acid)* en anglais) [111,112], de polycaprolactone [62,113,114] ou encore de polysaccharides d'alginate-chitosan [115].

Cependant certaines études ont plus de difficultés à mettre en évidence des résultats permettant de recommander le recours plutôt à du LP ou du SVF pour enrichir le milieu de culture des CSM [55,116]. Les résultats semblent en réalité très dépendants du(des) donneur(s) [117] et de la technique de préparation du lysat plaquettaire [17], ce qui pose le double soucis de l'efficacité et de la reproductibilité des procédés d'obtention [17]. Du lysat canin par exemple est moins efficace que le SVF en adjuvant de milieu de culture de CSM issues de la moelle osseuse [118], alors que du lysat équin, sans apporter de meilleurs résultats que le SVF, présente un potentiel au moins comparable [119]. Chez l'Homme, Lohmann et *al.* en 2012 ont démontré que l'enrichissement de milieux de culture cellulaire avec du LP issu de donneurs jeunes tend à favoriser davantage la prolifération et la différenciation ostéoblastique des CSM qu'un LP issu de donneurs plus âgés [120].

Les paramètres utilisés pour la préparation des LP [121,122] (notamment les vitesses et les temps de centrifugation) affectent particulièrement la quantité de plaquettes isolées et donc l'enrichissement en facteurs de croissance qui en découlera dans le produit [121].

Enfin, il a toutefois été montré que la présence de LP dans le milieu de culture cellulaire avait un inconvénient, à savoir qu'elle pouvait affecter négativement les propriétés immunomodulatrices des CSM parce qu'elle semble associée à une réduction de l'influence inhibitrice des CSM sur la prolifération des lymphocytes T et natural killer [123,124]. Cela pourrait s'expliquer comme la conséquence de l'interaction entre les cellules et le fibrinogène qui conduit à une augmentation significative de l'expression de cytokines pro-inflammatoires et chimiotactiques (IL-6 et MCP-1) [125]. Cette notion a pu être confirmée avec le rétablissement de fonctions immunomodulatrices correctes des CSM lorsque du lysat plaquettaire dépourvu de fibrinogène est utilisé dans le milieu de culture [125] d'autant que cela ne semble pas influencer négativement la culture des cellules [126].

Malgré ces quelques limites que peut présenter le LP lors de la culture de CSM en laboratoire, il reste un produit de choix notamment pour réaliser *in vitro* de l'expansion cellulaire en amont de leur implantation chez l'Homme [95,127] et de façon très sûre car les protéines du LP n'induisent pas d'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) dans les CSM par rapport à des facteurs de croissance exogènes [128]. Il a également été montré sa capacité à promouvoir l'expansion de cellules stromales mésenchymateuses à plus grande échelle dans des bio-réacteurs [129,130], très étudiés pour leur capacité à fournir en un temps relativement court d'importantes quantités de cellules dont les propriétés structurelles et fonctionnelles sont similaires à celles cultivées manuellement en deux dimensions [131].

Au-delà de la famille des CSM, il est également possible d'utiliser le lysat plaquettaire pour développer des cultures de multiples autres types cellulaires comme les fibroblastes [132–136], les cellules endothéliales [75,137,138], les ostéoblastes [139], les myoblastes [140], les ténocytes [141], les kératinocytes [142] et certains lymphocytes [143]. Il participe au maintien de leurs hauts potentiels de survie et de prolifération.
Un résumé des conditions de culture de toutes les cellules précédemment citées est présenté dans le Tableau 2.

Le phénotype de certaines de ces cellules (notamment les chondrocytes [144–146], les ostéoblastes [139], les myoblastes [140], les kératinocytes [142] ou encore les monocytes [147]) peut même être orienté *in-vitro* vers une voie anti-inflammatoire lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu enrichi en LP. Ces caractéristiques présentent des perspectives intéressantes pour des applications dans le domaine de la cicatrisation [136,148]. Il est juste important que le protocole de culture stipule dès le départ le temps d'exposition au milieu car ce paramètre a une influence sur les propriétés finales des cellules. Par exemple, une exposition au long cours peut réduire le potentiel ostéogène de cellules osseuses en culture alors qu'une exposition de faible durée va plutôt favoriser les fonctions chimiotactiques et de prolifération de ces mêmes cellules [149].

Tableau 2 : Exemples, dans la littérature, de milieux de culture enrichis en lysat plaquettaire pour la culture de divers types cellulaires. Les proportions de LP sont variables entre les études mais ne dépassent pas 20%. Il est à noter que tous les auteurs ne rapportent pas d'utilisation d'héparine pour limiter la coagulation spontanée des milieux de culture en présence de LP, malgré les recommandations souvent claires des entreprises qui le commercialisent.

Types cellulaires	Proportion de LP dans le milieu	Autres composants possibles du milieu de culture
BM-MSC (CSM de moelle osseuse) [81,150,151]	5 à 10%	- Milieu α-MEM - Héparine (2UI/mL de lysat) - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine) - HEPES (pouvoir tampon) (25mmol/L) - L-glutamine (2mmol/L) - Human serum (AB type) (10%)
ASC (CSM issues du tissu adipeux) [150,152,153]	3 à 10%	- Milieu α-MEM ou DMEM - Héparine (2UI/mL de lysat) - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine) - (N2)-l-Alanyl-l-Glutamin (5mM)
UC-MSC (MSC issues de cordon ombilical) [102]	10%	- Milieu DMEM - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine)
Fibroblastes [154]	1 à 5%	- Milieu RPMI 1640 - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine) - L-glutamine (2mmol/L)
Tenocytes [141]	20%	- Milieu α-MEM - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine) - L-glutamine (2mmol/L)
Cellules endothéliales [155–157]	2% à 10%	- Milieu DMEM ou EBM ou EGM-2 (EBM modifié avec des cytokines) - Héparine (2UI/mL de lysat) - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine) - L-glutamine (2mmol/L)
Ostéoblastes [139]	5%	- Milieu Iscove (adapté aux ostéoblastes) - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine) - L-glutamine (2mmol/L)
Kératinocytes [158]	5 à 10%	- Milieu DMEM - L-glutamine (2mmol/L)
Myoblastes [159]	20%	- Milieu DMEM - Antibiotiques (pénicilline, streptomycine)

Pour conclure, la culture de diverses lignées cellulaires dans des milieux enrichis en lysat plaquettaire humain (hLP) est déjà largement décrite dans la littérature et leurs résultats justifient la poursuite des expérimentations concernant la croissance et l'expansion cellulaire *in vitro* [63,160–162]. Les perspectives offertes par ces produits s'orientent vers l'évaluation des propriétés de biocompatibilité et de bioactivité de biomatériaux conçus de/avec du lysat plaquettaire, ouvrant ensuite la voie aux essais *in vivo* chez l'animal.

La forme liquide du LP compromet cependant l'utilisation du produit dans de nombreuses situations cliniques et sa conservation dans le temps. Son association à d'autres biomatériaux porteurs (comme les céramiques biphasiques de phosphate de calcium par exemple pour la régénération osseuse) permet de compenser en partie ses mauvaises propriétés mécaniques.

c. *Conception de biomatériaux contenant du lysat plaquettaire et résultats in vivo*

Le principe de conception de biomatériaux à partir de LP repose sur la propriété du LP de pouvoir polymériser en un réseau fibreux [163] capable aussi bien de se mêler à d'autres structures fibreuses que d'être encapsulé pour être ensuite libéré. En laboratoire, des particules d'alginate de calcium [164] ou d'acide hyaluronique [165–167], du collagène [168], du chondroïtine sulfate (CS) [169,170], du glutamate de chitosan associé à du hyaluronate de sodium [171] ou des solutions de sérine-glycine [172], des microparticules de silice [173] ou encore des micelles ioniques de chitosan et d'acide oléique chargées en

sulfadiazine argentique [174] ont ainsi déjà été associées à du lysat plaquettaire. Dans une optique future d'application sur des plaies chroniques de la cornée, il a également été combiné avec un antibiotique (la vancomycine) dans des particules d'alginate de calcium et d'acide hyaluronique [175], mais également avec du chitosan, de l'acide polyglycolique (PGA) [176] ou même du CS [177], cette dernière combinaison permettant notamment la stabilisation des facteurs de croissance du LP du fait de la présence de charges positives sur les molécules de CS [178]. Outre ces diverses associations, le lysat peut aussi être utilisé sous la forme d'un patch, contenant également de la génipine pour renforcer sa stabilité, qui permet sa libération progressive [41] ou même comme revêtement de fils de suture pour en améliorer la biocompatibilité [179].

L'ensemble des biomatériaux cités ci-dessus permettent une libération des facteurs de croissance au cours du temps. Les propriétés angiogéniques du LP, ainsi que son potentiel à favoriser le remodelage de la matrice extracellulaire [180] et les mécanismes pro-inflammatoires [181,182], contribuent à orienter la recherche vers les domaines généraux de la cicatrisation des plaies chroniques [183] (notamment les plaies cornéennes chroniques et les ulcères chroniques de peau) et tendineuses [184]. La création d'un environnement fibreux tridimensionnel est favorable à la formation d'un réseau microvasculaire et l'association du LP avec des cellules progénitrices endothéliales [163] ou des CSM [185,186] ne pourra que renforcer ses propriétés pro-angiogéniques [187,188].

Ainsi, les résultats obtenus *in vitro* avec les lysats plaquettaires confirment la nécessité de poursuivre les investigations dans le monde du vivant chez l'animal. Selon les indications choisies, il pourra être utilisé en combinaison avec d'autres matériaux, comme un biomatériau à part entière ou simplement comme adjuvant de milieu de culture cellulaire.

La cicatrisation, notamment cutanée, est un domaine majeur vers lequel sont orientées les études menées sur le lysat plaquettaire. Chez un individu sain, le processus suit son cours de façon normale et régulée sans nécessiter systématiquement d'intervention, mais chez certaines personnes, il s'avère plus compliqué et il entre dans la chronicité. C'est à ce moment-là que la mise en contact d'un biomatériau avec la plaie peut trouver son intérêt pour :

- ré-initier le processus de cicatrisation *via* la stimulation des cellules concernées,
- guider la migration cellulaire et la synthèse de fibres,
- favoriser la restauration d'un contexte immunologique correct.

Plusieurs biomatériaux incluant du lysat plaquettaire ont ainsi déjà été testés chez l'animal. Leurs types et les modèles utilisés sont résumés dans le tableau 3. Seul il peut être appliqué directement sur une plaie cutanée [189] mais il peut aussi être combiné à des matrices de collagène +/- gélatine [190–192], des particules de pectine-chitosan [193], du glutamate de chitosan [171] ou encore des implants en polyéthylène [194]. Tous sont capables de libérer progressivement le lysat.

Outre l'application cutanée, d'autres formes galéniques d'utilisation du lysat plaquettaire ont déjà été élaborées comme les injections sur des modèles d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques [195,196] ou même des sprays nasaux sur des modèles murins de la maladie de Parkinson [197].

Le potentiel ostéogénique du LP seul ayant été évalué avec des taux de succès variables dans la littérature [65,66], plusieurs associations avec des substituts osseux minéralisés ont également été envisagées [198] afin d'améliorer les propriétés mécaniques du réseau fibreux constitué à partir de LP et de constituer un environnement plus proche de la structure osseuse que ne l'est le lysat seul.

Le recours au LP s'avère également prometteur dans le contexte de pathologies ostéo-articulaires comme le sont l'ostéoarthrite [199] ou encore la parodontite qui touche les tissus de soutien des dents [200,201].

Tableau 3 : Etudes précliniques *in vivo* ayant évalué l'utilisation du lysat plaquettaire pour le traitement de diverses pathologies. La mention "Oui" dans la colonne de droite indique la validation de la formulation à base de LP pour de futures études ; alors que la mention « A confirmer » indique la nécessité de réaliser davantage d'études expérimentales et précliniques pour valider le recours à la formulation en question. Les études dans lesquelles le LP a uniquement été utilisé comme adjuvant pour milieu de culture pour des cellules ensuite injectées n'ont pas été listées ici.

Auteurs	Date	Pays	Animal	Origine du LP	Pathologie	Mode d'utilisation du LP	Contrôles	Conclut à l'intérêt du LP
Seker et *al.* [202]	2020	Turquie	Rat	Humain	Régénération tissulaire au sens large	Cryogels de LP et de dextran oxydés	Différentes concentrations	Oui
Yousefi-Ahmadipour et *al*. [203]	2020	Iran	Rat	Rat	Colite	Injections intra-péritonéales avec ou sans Sulfasalazine	Multiples	Oui
Bolte et *al.* [204]	2019	Allemagne	Souris	Humain	Formation osseuse	Seul ou associé à des CSM	Contrôle négatif	Mitigé
Gupta et *al.* [205]	2019	Belgique	Souris	Humain	Formation osseuse	Avec cellules (progéniteurs osseux) et scaffold de phosphate de calcium (PC)	Scaffold seul	Oui
Huang et *al*. [206]	2019	Taïwan	Rat	Humain	Lésion du nerf de la cornée	Application directe	Larmes artificielles	Oui
Najafi et *al.* [207]	2019	Iran	Hamster	Humain	Mycose sous-cutané	Injection sous-cutanée	PRP Contrôle négatif	Oui
Notodihardjo et *al.* [192]	2019	Japon	Souris	Humain	Plaie cutanée	LP lyophilisé imprégné dans des disques de gélatine	Plusieurs concentrations	Oui
Notodihardjo et *al.* [191]	2019	Japon	Souris	Humain	Plaie cutanée	LP lyophilisé imprégné dans des disques de gélatine	LP congelé	Oui
Silva-Cote et *al.* [208]	2019	Colombie	Souris	Humain	Formation osseuse	Avec CSM sur matrice de collagène	Sans CSM	Indirectement
Bonferoni et *al*. [209]	2018	Italie	Rat	Humain	Plaie cutanée	Avec du glutamate de chitosan désséché par congélation	Structure seule Solution saline	Oui
Chen et *al.* [210]	2018	Taïwan	Rat	Humain	Plaie de la cornée	Application directe LP lyophilisé	LP liquide	Oui
Babo et *al*. [200]	2017	Portugal	Rat	Humain	Parodontite	Avec un ciment de PC	CPC seul	Oui

Huang et *al.* [211]	2017	Taïwan	Rat	Humain	Plaie de la cornée	Application directe	Human serum SVF	Oui
Babo et *al*. [212]	2016	Portugal	Rat	Humain	Formation osseuse	Avec un CPC et des microsphères d'acide hyaluroniques cross-linkées avec de l'hydrazide	Matériau seul Défaut vide	A confirmer
Babo et *al*. [201]	2016	Portugal	Rat	Humain	Parodontite	Avec ciment de PC, PLGA microsphères, cellules	Sans cellules	Oui
Ozturk et *al*. [194]	2016	Turquie	Rat	Rat	Echec implantaire	Injection sous-cutanée	Colle Contrôle négatif	A confirmer
Sergeeva et *al*. [189]	2016	Russie	Rat	Rat	Plaie cutanée	Application directe	Solution saline	Oui
Tenci et *al*. [193]	2016	Italie	Rat	Humain	Ulcères chroniques de peau	Encapsulé dans des particules de pectine-chitosan	Particules avec du miel Solution saline	Oui
Tyrnenopoulou et *al*. [199]	2016	Grèce	Cheval	Equine	Ostéoarthrite	Injections intra-articulaires	Solution saline	Oui
Chakar et *al*. [66]	2015	France	Lapin	Lapin	Formation osseuse	Seul ou associé avec divers substituts	Solution saline	Oui
Zhang et *al*. [195]	2015	Chine	Rat	Humain	AVC	Injections locales	Albumine Solution saline Sans traitement	Oui
Chakar et *al*. [65]	2014	France	Lapin	Lapin	Formation osseuse	Associé avec divers substituts	Solution saline	Non
Ito et *al*. [190]	2013	Japon	Souris	Humain	Plaie cutanée	Encapsulé dans une structure de collagène et de gélatine	Solution saline	Oui
Dozza et *al*. [67]	2011	Italie	Mouton	Mouton	Prothèse de hanche	Avec des cellules stromales mésenchymateuses dans divers matériaux	Prothèse seule	Oui

d. Applications cliniques chez l'Homme du lysat plaquettaire

Parmi toutes les études cliniques déjà menées sur le sujet (Tableau 4), le site anatomique pour lequel l'utilisation de LP a été le plus étudié s'avère être l'œil, et plus particulièrement la cornée. Sous la forme d'une lotion oculaire, le lysat est en effet préconisé par certains auteurs pour une application quotidienne chez des patients atteints de complications de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) [213–215], du syndrome de Sjögren [216] ou même d'ulcères chroniques de la cornée [217]. L'application répétée de gouttes de LP n'a pas eu d'effet néfaste sur la structure oculaire et s'avère bien tolérée d'après les auteurs qui l'ont étudiée [218]. Le traitement doit s'envisager sur plusieurs mois [219].

Par ailleurs, les pathologies inflammatoires chroniques, qui affectent considérablement la qualité de vie des patients, représentent également des candidates potentielles à des traitements à base de LP. A l'heure actuelle, les thérapies qui existent sont souvent destinées à soulager les symptômes sans résoudre les mécanismes physiopathologiques eux-mêmes. Le recours au LP a ainsi été envisagé sous la forme d'injections ostéo-musculo-articulaires en cas d'arthrose, d'ostéoarthrite ou même de pseudo-arthrose aseptique (dans ce cas des CSM ont été injectées de façon concomitante) avec des résultats très encourageants [220–223]. Des patients atteints d'épicondylite (ou « *tennis elbow* ») ont par exemple décrit une réduction rapide des symptômes douloureux lors du traitement et avaient retrouvé une fonction correcte lors de la réévaluation à un an [224,225]. Au niveau muqueux, Del Fante et *al.* ont proposé une formulation muco-adhésive riche en LP pour lutter contre l'érosion épithéliale et l'ulcération sous-jacente du conjonctif dans le cadre de phénomènes inflammatoires tels que la mucosite [226]. Pour l'instant aucune de ces formulations n'a encore fait son apparition sur le marché, la faute certainement à des résultats encore non reproductibles comme un succès

inconstant chez des patients souffrant de mucosite liée au GvHD [226] ou d'ulcères veineux chroniques [227].

Enfin, d'autres études ont encore été entreprises pour évaluer le potentiel effet curatif du lysat plaquettaire sur les douleurs lombaires grâce à des injections péridurales [228] ou sur l'alopécie [229] car le lysat serait susceptible d'activer des voies cellulaires favorisant la repousse des cheveux [230,231].

Tableau 4 : Résumé des études cliniques rapportant l'utilisation de lysat plaquettaire pour le traitement de diverses pathologies. La mention « A confirmer » indique que davantage d'études sont nécessaires pour permettre de conclure à un effet positif du traitement à base de LP. L'abréviation « GvHD » indique un syndrome du greffon contre l'hôte. Les études de thérapie cellulaire exclusive pour lesquelles des cellules cultivées en milieu enrichi en LP étaient réinjectées chez le patient n'ont pas été présentées.

Auteurs	Date	Pays	Pathologie	Mode d'utilisation du LP	Traitement contrôle	Nombre de patients	Conclut à l'intérêt du LP
Protogerou et *al.* [232]	2020	Grèce	Troubles de l'érection	Injection de LP et d'ASC	Pas présenté ici	5	Oui
Rawson et *al.* [233]	2020	Etats-Unis	Hernie discale	Injections	Aucun	2	Oui
Ahmed et *al.* [234]	2019	Egypte	Ulcères de la muqueuse orale chez patients sous méthotrexate	Formulation muco-adhésive	Clobetasol	30	Oui
Protogerou et *al.* [235]	2019	Grèce	Troubles de l'érection	Injection de LP +/- ASC	Aucun	8	Oui
Centeno et *al.* [228]	2017	Etats-Unis	Douleurs du rachis lombaire	Injections épidurales	Aucun	470	Oui
Cole et *al.* [229]	2017	Etats-Unis	Alopécie	Application directe	PRP, sol. Saline	3	Oui
Pezzotta et *al.* [218]	2017	Italie	GvHD oculaire réfractaire	Lotion oculaire	Aucun	31	Oui
Fea et *al.* [216]	2016	Italie	Sècheresse oculaire (Synd. Sjögren)	Lotion oculaire	Larmes artificielles	30	Oui
Tan et *al.* [224]	2016	Chine	Tennis-elbow	Injections	Aucun	56	Oui
Valentini et *al.* [214]	2016	Italie	GvHD oculaire réfractaire	Lotion oculaire	Aucun	6	Oui
Zallio et *al.* [213]	2016	Italie	GvHD oculaire réfractaire	Lotion oculaire	Aucun	26	Oui
Al-Ajlouni et *al.* [220]	2015	Jordanie	Ostéoarthrite du genou	Injections intra-articulaires	Aucun	48	Oui

Rizzo et *al.* [221]	2014	Italie	Désordres musculo-squelettiques	Injections (+ thrombine)	Aucun	140	A confirmer
Pezzotta et *al.* [215]	2012	Italie	GvHD oculaire réfractaire	Lotion oculaire	Aucun	23	Oui
Del Fante et *al.* [226]	2011	Italie	Mucosite orale liée au GvHD	Formulation mucoadhésive	Aucun	7	Oui
Scudeller et *al.* [225]	2011	Italie	Tennis-elbow	Injections	Sans traitement	1	A confirmer
Geremicca et *al.* [217]	2010	Italie	Ulcères de la cornée	Lotion oculaire	Aucun	103	Oui
Stacey et *al.* [227]	2000	Australie	Ulcères veineux chroniques	Application directe	Placebo	86	Non

III. Discussion générale sur le recours aux lysats plaquettaires

Le lysat plaquettaire est ainsi un dérivé sanguin riche en facteurs de croissance et capable de promouvoir la cicatrisation de tissus biologiques [33,56]. Il est utilisé de façon connue et validée pour la culture de cellules stromales mésenchymateuses [236] avec l'avantage principal par rapport au sérum de veau fœtal de ne pas être d'origine xénogène. Le recours à ce dernier type de produit est en effet très restreint et peut bloquer nombre de projets d'un point de vue règlementaire. Divers protocoles ont déjà été validés pour s'assurer de la reproductibilité et de la qualité des cultures de CSM dans des milieux enrichis en LP avant une implantation par exemple pour de la régénération osseuse [91,237,238].

Le recours au LP en tant que tel chez l'Homme montre des résultats prometteurs dans l'évolution des phénomènes inflammatoires. Les taux de succès sont meilleurs pour les traitements des tissus mous plutôt que ceux des tissus durs mais ils sont à nuancer selon la façon dont le lysat est administré. Des injections permettent de délivrer des facteurs de croissance sur le site de la pathologie mais ne permettent pas de constituer une structure sur laquelle les cellules engagées dans la cicatrisation pourront se développer et se différencier comme cela est le cas avec des hydrogels. L'avenir de leur utilisation semble donc résider dans une combinaison du LP avec des matrices fibreuses ou minéralisées, certaines ayant déjà montré des résultats intéressants *in vitro* et *in vivo* sur la migration cellulaire, la formation de nouveaux tissus et la néoangiogenèse.

Sous certaines conditions expérimentales, le lysat plaquettaire peut être préparé comme un hydrogel au sein duquel un réseau de fibres de fibrine a polymérisé, mimant une matrice extracellulaire [163]. Dans l'optique d'une implantation *in vivo*, cette matrice constituerait un environnement favorable à la survie et au développement des cellules de l'hôte [71]. Ce type

de gel de LP est décrit dans la littérature comme une « matrice naturelle temporaire » qui est destinée à être remplacée par une nouvelle matrice extracellulaire naturelle une fois le réseau implanté résorbé [239].

L'étude des réseaux de fibres d'origine naturelle n'est pas récente [240,241], et la liste des polymères pouvant constituer ces réseaux ne cesse de s'allonger avec le temps, le plus connu d'entre eux étant le collagène [242]. Devant l'intérêt croissant pour ce type de structure, leur cahier des charges pour une utilisation à visée régénératrice a été dressé petit à petit [243]. La matrice fibreuse doit ainsi être :

- Biocompatible,
- Dégradable avec une vitesse de dégradation compatible avec la formation d'un nouveau tissu naturel,
- Résistante aux contraintes mécaniques,
- Capable de transmettre les contraintes aux tissus environnants de la même façon qu'un tissu naturel (il est question de biomimétisme mécanique),
- Poreuse et rugueuse pour que son état de surface soit compatible avec la colonisation et l'adhésion cellulaire ainsi qu'avec la diffusion d'ions et de molécules.

Pour Gomes et *al*. en 2012, le développement de nouvelles générations de matrices selon l'ensemble des critères de performance listés ci-dessus permettrait d'outrepasser les limites de tous les matériaux déjà existants aujourd'hui [244].

Toutefois, le lysat plaquettaire sous sa forme d'hydrogel ne remplit pas tous les critères du cahier des charges. En effet, outre sa faible résistance mécanique, il est très rapidement colonisé par les cellules environnantes une fois implanté et sa résorption est initiée trop rapidement [240]. Des améliorations sont à envisager pour s'affranchir de ces problèmes car d'un point de vue biologique en revanche le recours au LP est pleinement justifié. L'ensemble des effets positifs sur la cicatrisation est intrinsèquement lié à la présence des facteurs de

croissance qui stimulent la prolifération et l'activité de cellules comme les cellules endothéliales pour le VEGF [43]. Cependant, ces facteurs de croissance sont également retrouvés dans les autres concentrés plaquettaires comme le PRF et le PRP qui sont eux déjà couramment utilisés en laboratoire mais aussi et surtout en clinique, avec des indications tout à fait similaires à celles décrites précédemment pour le LP à savoir la culture de cellules stromales mésenchymateuses [245,246] et la régénération tissulaire chez l'Homme [22,247,248]. La principale différence entre ces différents concentrés repose sur la disponibilité des facteurs de croissance et des protéines au sens large dans leur composition. En effet, il n'y a que dans le lysat plaquettaire que les membranes cellulaires sont détruites et que le contenu du cytoplasme est accessible directement au sein du produit. Dans le PRF et le PRP, les cellules sont encore intactes et un délai s'avèrera nécessaire après l'implantation pour que les facteurs d'intérêts soient libérés, avec un risque possible de nécrose de certaines cellules durant ce laps de temps. Un PRF particulier a en outre récemment vu le jour sous une forme plus liquide (les auteurs parlent de PRF injectable, ou iPRF) grâce à une rapide centrifugation à faible vitesse [249]. Son contenu ne semble pour autant pas diffèrent du PRF classique et les cellules ne subissent pas non plus de procédure destinée à les lyser.

L'objectif clinique du recours à ces biomatériaux dérivés du sang reste la régénération *ad integrum* des tissus c'est-à-dire la restauration de leur structure et de leur(s) fonction(s) telles qu'elles existaient avant leur destruction. Toutefois dans certaines conditions pathologiques, cet objectif doit être nuancé pour privilégier la stabilisation de cette pathologie avant de penser à la régénération tissulaire. Les thérapies régénératrices comme celles-ci rentrent dans la grande famille de l'ingénierie tissulaire et leur succès est intrinsèquement lié au potentiel de réaction des cellules de l'hôte. En effet, les biomatériaux implantés devront optimiser la réponse des cellules environnantes (éventuellement également celle des cellules greffées si tel

est le cas) pour reprendre un processus menant à la cicatrisation et à la formation de nouveaux tissus. Si une telle stimulation se produit, le biomatériau est considéré comme bioactif. Cela étant le cas pour une structure enrichie en facteurs de croissance [250], le lysat plaquettaire y trouve sa place.

Cliniquement, son utilisation se cantonne pour l'instant à des études chez l'Homme pour des pathologies inflammatoires chroniques, par exemple sur des plaies cutanées et tissulaires [33,56] ou même des mucosites [226]. Dans ce dernier cas, sept patients ont été traités pour une inflammation gingivale à l'aide d'une formulation muco-adhésive à base de lysat plaquettaire et six d'entre eux ont montré une réponse favorable au traitement. L'intérêt du recours au LP réside dans la disponibilité immédiate des protéines et facteurs de croissance sur le site où ils sont appliqués.

Devant la difficulté à manipuler et à conserver les lysats plaquettaires sous forme liquide, mais également sous forme gélifiée, nous nous proposons dans la suite de ce travail de présenter un procédé permettant de concevoir un biomatériau sec et poreux à base de LP, qui soit plus aisément manipulable par les praticiens.

IV. Références de la première partie

[1] Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. J Cell Biol 2013;201:785–96. https://doi.org/10.1083/jcb.201304054.

[2] Canceill T, Campana S-C, Joniot S, Cazalbou S. From Coagulation to Oral Surgery Application: Platelets in Bone Regeneration. Clin Surg 2018;3:6.

[3] Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:140–56. https://doi.org/10.1038/nrm1014.

[4] Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. Blood Rev 2007;21:131–42. https://doi.org/10.1016/j.blre.2006.11.001.

[5] Smith GF. Fibrinogen-fibrin conversion. The mechanism of fibrin-polymer formation in solution. Biochem J 1980;185:1–11.

[6] Siebenlist KR, DiOrio JP, Budzynski AZ, Mosesson MW. The polymerization and thrombin-binding properties of des-(B beta 1-42)-fibrin. J Biol Chem 1990;265:18650–5.

[7] Blackburn EK, Macfie JM, Monaghan JH, Page APM. Antihaemophilic factor deficiency, capillary defect of von Willebrand type, and idiopathic thrombocytopenia occurring in one family. J Clin Pathol 1961;14:540–2. https://doi.org/10.1136/jcp.14.5.540.

[8] Wright JH, Minot GR. THE VISCOUS METAMORPHOSIS OF THE BLOOD PLATELETS. J Exp Med 1917;26:395–409. https://doi.org/10.1084/jem.26.3.395.

[9] Kirchhofer D, Nemerson Y. Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex. Curr Opin Biotechnol 1996;7:386–91.

[10] Edgington TS, Dickinson CD, Ruf W. The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. Thromb Haemost 1997;78:401–5.

[11] Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. J Thromb Haemost JTH 2007;5:1097–105. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02435.x.

[12] Bezeaud A, Guillin M-C. Physiologie de la coagulation. EMC 13-019--20 2001.

[13] Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. Thromb Haemost 2002;88:186–93.

[14] Blombäck B, Hessel B, Hogg D. Disulfide bridges in nh2 -terminal part of human fibrinogen. Thromb Res 1976;8:639–58.

[15] Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. Ann N Y Acad Sci 2001;936:11–30.

[16] Carr ME, Gabriel DA, McDonagh J. Influence of Ca2+ on the structure of reptilase-derived and thrombin-derived fibrin gels. Biochem J 1986;239:513–6.

[17] Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? Biomaterials 2016;76:371–87. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.065.

[18] Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. Transplantation 2004;77:350–5. https://doi.org/10.1097/01.TP.0000112381.80964.85.

[19] Zurita M, Otero L, Aguayo C, Bonilla C, Ferreira E, Parajón A, et al. Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells. Cytotherapy 2010;12:522–37. https://doi.org/10.3109/14653241003615164.

[20] Michallet M, Pitard A. Transfusion de plaquettes : produits, indications. Haute Autorité de Santé; 2015.

[21] Slichter SJ, Harker LA. Preparation and storage of platelet concentrates. Transfusion (Paris) 1976;16:8–12.

[22] Shah R, M G T, Thomas R, Mehta DS. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. Eur J Prosthodont Restor Dent 2017;25:64–72. https://doi.org/10.1922/EJPRD_01690Shah09.

[23] Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends Biotechnol 2009;27:158–67. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009.

[24] Arora S, Kotwal U, Dogra M, Doda V. Growth Factor Variation in Two Types of Autologous Platelet Biomaterials: PRP Versus PRF. Indian J Hematol Blood Transfus Off J Indian Soc Hematol Blood Transfus 2017;33:288–92. https://doi.org/10.1007/s12288-016-0721-8.

[25] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg 2004;62:489–96.

[26] Canceill T, Campana S-C, Blasco-Baque V, Monsarrat P, Kichenbrand C, Joniot S, et al. Les concentrés plaquettaires en chirurgie orale : quand la biologie et les matériaux ne font qu'un. BioMatériaux Clin 2020;5.

[27] Figueroa F. Uso de PRP en Sutura Meniscal. Rev Artrosc 2020;27:36–40.

[28] Bosetti M, Boffano P, Marchetti A, Leigheb M, Colli M, Brucoli M. The Number of Platelets in Patient's Blood Influences the Mechanical and Morphological Properties of PRP-Clot and Lysophosphatidic Acid Quantity in PRP. Int J Mol Sci 2019;21:139. https://doi.org/10.3390/ijms21010139.

[29] Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H, et al. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). Int J Implant Dent 2016;2:19. https://doi.org/10.1186/s40729-016-0052-4.

[30] Anitua E, Prado R, Nurden AT, Nurden P. Characterization of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF): components and formulations. In: Anitua E, Cugat R, Sánchez M, editors. Platelet Rich Plasma Orthop. Sports Med., Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 29–45. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63730-3_2.

[31] Nishiyama K, Okudera T, Watanabe T, Isobe K, Suzuki M, Masuki H, et al. Basic characteristics of plasma rich in growth factors (PRGF): blood cell components and biological effects. Clin Exp Dent Res 2016;2:96–103. https://doi.org/10.1002/cre2.26.

[32] Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. Pract Proced Aesthetic Dent PPAD 2001;13:487–93; quiz 487–93.

[33] Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:e56-60. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011.

[34] Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;101:e37-44. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008.

[35] Wu C-L, Lee S-S, Tsai C-H, Lu K-H, Zhao J-H, Chang Y-C. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. Aust Dent J 2012;57:207–12. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01686.x.

[36] Hauser F, Gaydarov N, Badoud I, Vazquez L, Bernard J-P, Ammann P. Clinical and histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study. Implant Dent 2013;22:295–303. https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182906eb3.

[37] Sam G, Vadakkekuttical RJ, Amol NV. In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. J Indian Soc Periodontol 2015;19:32–6. https://doi.org/10.4103/0972-124X.145821.

[38] Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. Platelets 2018;29:171–84. https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812.

[39] Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. J Cutan Aesthetic Surg 2014;7:189–97. https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734.

[40] Viau S, Chabrand L, Eap S, Lorant J, Rouger K, Goudaliez F, et al. Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. PloS One 2017;12:e0181406. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181406.

[41] Costa-Almeida R, Franco AR, Pesqueira T, Oliveira MB, Babo PS, Leonor IB, et al. The effects of platelet lysate patches on the activity of tendon-derived cells. Acta Biomater 2018. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.006.

[42] Chen M-S, Wang T-J, Lin H-C, Burnouf T. Four types of human platelet lysate, including one virally inactivated by solvent-detergent, can be used to propagate Wharton jelly mesenchymal stromal cells. New Biotechnol 2019;49:151–60. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.003.

[43] Ehrbar M, Metters A, Zammaretti P, Hubbell JA, Zisch AH. Endothelial cell proliferation and progenitor maturation by fibrin-bound VEGF variants with differential susceptibilities to local cellular activity. J Control Release Off J Control Release Soc 2005;101:93–109. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.018.

[44] Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction - A brief update. Vascul Pharmacol 2016;86:14–7. https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.011.

[45] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes Dev 2008;22:1276–312. https://doi.org/10.1101/gad.1653708.

[46] Demoulin J-B, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. Cytokine Growth Factor Rev 2014;25:273–83. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.03.003.

[47] Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. Semin Cell Dev Biol 2014;28:2–11. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.011.

[48] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. Cell 2003;113:685–700. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X.

[49] Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. Trends Immunol 2010;31:220–7. https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002.

[50] Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. Genome Biol 2001;2. https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005.

[51] Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell 1993;75:73–82.

[52] MACO PHARMA. Multi PL'100 Technical Data 2017.

[53] Sellberg F, Berglund E, Ronaghi M, Strandberg G, Löf H, Sommar P, et al. Composition of growth factors and cytokines in lysates obtained from fresh versus stored pathogen-inactivated platelet units. Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis 2016;55:333–7. https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.08.004.

[54] Schallmoser K, Henschler R, Gabriel C, Koh MBC, Burnouf T. Production and Quality Requirements of Human Platelet Lysate: A Position Statement from the Working Party on Cellular Therapies of the International Society of Blood Transfusion. Trends Biotechnol 2019. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.06.002.

[55] Shih DT-B, Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. New Biotechnol 2015;32:199–211. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.06.001.

[56] Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, Granjeiro JM, Borojevic R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. PloS One 2014;9:e104662. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104662.

[57] David B. L'EFS vous connaissez ? Réanimation 2008;17:418–25. https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2008.03.017.

[58] Naskou MC, Sumner SM, Chocallo A, Kemelmakher H, Thoresen M, Copland I, et al. Platelet lysate as a novel serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther 2018;9:75. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0823-3.

[59] Kol A, Walker NJ, Galuppo LD, Clark KC, Buerchler S, Bernanke A, et al. Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. Equine Vet J 2013;45:193–8. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00600.x.

[60] Chapman H-S, Gale AL, Dodson ME, Linardi RL, Ortved KF. Autologous Platelet Lysate Does Not Enhance Chondrogenic Differentiation of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Despite Increased TGF-β1 Concentration. Stem Cells Dev 2020;29:144–55. https://doi.org/10.1089/scd.2019.0239.

[61] Russell WE, McGowan JA, Bucher NL. Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. J Cell Physiol 1984;119:183–92. https://doi.org/10.1002/jcp.1041190207.

[62] Casanova MR, Alves da Silva M, Costa-Pinto AR, Reis RL, Martins A, Neves NM. Chondrogenesis-inductive nanofibrous substrate using both biological fluids and mesenchymal stem cells from an autologous source. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2019;98:1169–78. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.069.

[63] Johansson L, Klinth J, Holmqvist O, Ohlson S. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? Cytotechnology 2003;42:67–74. https://doi.org/10.1023/B:CYTO.0000009820.72920.cf.

[64] Rasmussen BS, Sørensen CL, Vester-Glowinski PV, Herly M, Kurbegovic S, Ørholt M, et al. A Novel Porcine Model for Future Studies of Cell-enriched Fat Grafting. Plast Reconstr Surg Glob Open 2018;6:e1735. https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001735.

[65] Chakar C, Naaman N, Soffer E, Cohen N, El Osta N, Petite H, et al. Bone formation with deproteinized bovine bone mineral or biphasic calcium phosphate in the presence of autologous platelet lysate: comparative investigation in rabbit. Int J Biomater 2014;2014:367265. https://doi.org/10.1155/2014/367265.

[66] Chakar C, Soffer E, Cohen N, Petite H, Naaman N, Anagnostou F. Vertical bone regeneration with deproteinised bovine bone mineral or biphasic calcium phosphate in

the rabbit calvarium: effect of autologous platelet lysate. J Mater Sci Mater Med 2015;26:5339. https://doi.org/10.1007/s10856-014-5339-5.

[67] Dozza B, Di Bella C, Lucarelli E, Giavaresi G, Fini M, Tazzari PL, et al. Mesenchymal stem cells and platelet lysate in fibrin or collagen scaffold promote non-cemented hip prosthesis integration. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc 2011;29:961–8. https://doi.org/10.1002/jor.21333.

[68] Jayme DW, Smith SR. Media formulation options and manufacturing process controls to safeguard against introduction of animal origin contaminants in animal cell culture. Cytotechnology 2000;33:27–36. https://doi.org/10.1023/A:1008133717035.

[69] Shanbhag S, Stavropoulos A, Suliman S, Hervig T, Mustafa K. Efficacy of Humanized Mesenchymal Stem Cell Cultures for Bone Tissue Engineering: A Systematic Review with a Focus on Platelet Derivatives. Tissue Eng Part B Rev 2017;23:552–69. https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2017.0093.

[70] Liu JW, Dunoyer-Geindre S, Serre-Beinier V, Mai G, Lambert J-F, Fish RJ, et al. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. J Thromb Haemost JTH 2007;5:826–34. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02381.x.

[71] Walenda G, Hemeda H, Schneider RK, Merkel R, Hoffmann B, Wagner W. Human platelet lysate gel provides a novel three dimensional-matrix for enhanced culture expansion of mesenchymal stromal cells. Tissue Eng Part C Methods 2012;18:924–34. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2011.0541.

[72] Mohamed MS, Chen Y, Yao C-L. A serum-free medium developed for in vitro expansion of murine intestinal stem cells. Biotechnol J 2014;9:962–70. https://doi.org/10.1002/biot.201400016.

[73] Eastment CT, Sirbasku DA. Human platelet lysate contains growth factor activities for established cell lines derived from various tissues of several species. In Vitro 1980;16:694–705. https://doi.org/10.1007/bf02619199.

[74] Giles AR, Nesheim ME, Hoogendoorn H, Tracy PB, Mann KG. Stroma free human platelet lysates potentiate the in vivo thrombogenicity of factor Xa by the provision of coagulant-active phospholipid. Br J Haematol 1982;51:457–68. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1982.tb02803.x.

[75] Wang T-J, Chen M-S, Chou M-L, Lin H-C, Seghatchian J, Burnouf T. Comparison of three human platelet lysates used as supplements for in vitro expansion of corneal

endothelium cells. Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis 2017;56:769–73. https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.08.021.

[76] Laner-Plamberger S, Oeller M, Poupardin R, Krisch L, Hochmann S, Kalathur R, et al. Heparin Differentially Impacts Gene Expression of Stromal Cells from Various Tissues. Sci Rep 2019;9:7258. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43700-x.

[77] Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2014;16:170–80. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004.

[78] Luzzani C, Neiman G, Garate X, Questa M, Solari C, Fernandez Espinosa D, et al. A therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement. Stem Cell Res Ther 2015;6:6. https://doi.org/10.1186/scrt540.

[79] Hemeda H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. Cytotherapy 2013;15:1174–81. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.006.

[80] Burnouf T, Chou M-L, Wu Y-W, Su C-Y, Lee L-W. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. Transfusion (Paris) 2013;53:138–46. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03668.x.

[81] Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. Transfusion (Paris) 2007;47:1436–46. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x.

[82] Laitinen A, Oja S, Kilpinen L, Kaartinen T, Möller J, Laitinen S, et al. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Cytotechnology 2016;68:891–906. https://doi.org/10.1007/s10616-014-9841-x.

[83] Vennila R, Raja Sundari M Sundaram null, Selvaraj S, Srinivasan P, Pathak S, Rupert S, et al. Effect of Human Platelet Lysate in Differentiation of Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2019;19:1177–91. https://doi.org/10.2174/1871530319666190226165910.

[84] Loubière C, Sion C, De Isla N, Reppel L, Guedon E, Chevalot I, et al. Impact of the type of microcarrier and agitation modes on the expansion performances of

mesenchymal stem cells derived from umbilical cord. Biotechnol Prog 2019;35:e2887. https://doi.org/10.1002/btpr.2887.

[85] Czapla J, Matuszczak S, Kulik K, Wiśniewska E, Pilny E, Jarosz-Biej M, et al. The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. Stem Cell Res Ther 2019;10:235. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1331-9.

[86] Gao Y, Ku N-J, Sung T-C, Higuchi A, Hung C-S, Lee HH-C, et al. The effect of human platelet lysate on the differentiation ability of human adipose-derived stem cells cultured on ECM-coated surfaces. J Mater Chem B 2019;7:7110–9. https://doi.org/10.1039/c9tb01764j.

[87] Fuoco NL, de Oliveira RG, Marcelino MY, Stessuk T, Sakalem ME, Medina DAL, et al. Efficient isolation and proliferation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells in xeno-free conditions. Mol Biol Rep 2020. https://doi.org/10.1007/s11033-020-05322-9.

[88] Bindal P, Gnanasegaran N, Bindal U, Haque N, Ramasamy TS, Chai WL, et al. Angiogenic effect of platelet-rich concentrates on dental pulp stem cells in inflamed microenvironment. Clin Oral Investig 2019;23:3821–31. https://doi.org/10.1007/s00784-019-02811-5.

[89] Saury C, Lardenois A, Schleder C, Leroux I, Lieubeau B, David L, et al. Human serum and platelet lysate are appropriate xeno-free alternatives for clinical-grade production of human MuStem cell batches. Stem Cell Res Ther 2018;9:128. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0852-y.

[90] Martinelli D, Pereira RC, Mogni M, Benelli R, Mastrogiacomo M, Coviello D, et al. A humanized system to expand in vitro amniotic fluid-derived stem cells intended for clinical application. Cytotherapy 2016;18:438–51. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.020.

[91] Prins H-J, Rozemuller H, Vonk-Griffioen S, Verweij VGM, Dhert WJA, Slaper-Cortenbach ICM, et al. Bone-forming capacity of mesenchymal stromal cells when cultured in the presence of human platelet lysate as substitute for fetal bovine serum. Tissue Eng Part A 2009;15:3741–51. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2008.0666.

[92] Salvadè A, Della Mina P, Gaddi D, Gatto F, Villa A, Bigoni M, et al. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects. Tissue Eng Part C Methods 2010;16:201–14. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2008.0572.

[93] Ma J, van den Beucken JJJP, Both SK, Prins H-J, Helder MN, Yang F, et al. Osteogenic capacity of human BM-MSCs, AT-MSCs and their co-cultures using HUVECs in FBS and PL supplemented media. J Tissue Eng Regen Med 2015;9:779–88. https://doi.org/10.1002/term.1704.

[94] Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, Berraeis L, Ben Othman T, Ducrocq E, et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. Stem Cell Res Ther 2012;3:6. https://doi.org/10.1186/scrt97.

[95] Shichinohe H, Kawabori M, Iijima H, Teramoto T, Abumiya T, Nakayama N, et al. Research on advanced intervention using novel bone marrOW stem cell (RAINBOW): a study protocol for a phase I, open-label, uncontrolled, dose-response trial of autologous bone marrow stromal cell transplantation in patients with acute ischemic stroke. BMC Neurol 2017;17:179. https://doi.org/10.1186/s12883-017-0955-6.

[96] Homayouni Moghadam F, Tayebi T, Moradi A, Nadri H, Barzegar K, Eslami G. Treatment with platelet lysate induces endothelial differentation of bone marrow mesenchymal stem cells under fluid shear stress. EXCLI J 2014;13:638–49.

[97] Homayouni Moghadam F, Tayebi T, Barzegar K. Differentiation of Rat bone marrow Mesenchymal stem cells into Adipocytes and Cardiomyocytes after treatment with platelet lysate. Int J Hematol-Oncol Stem Cell Res 2016;10:21–9.

[98] Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Cell Biol Int 2011;35:639–43. https://doi.org/10.1042/CBI20100361.

[99] Zaky SH, Ottonello A, Strada P, Cancedda R, Mastrogiacomo M. Platelet lysate favours in vitro expansion of human bone marrow stromal cells for bone and cartilage engineering. J Tissue Eng Regen Med 2008;2:472–81. https://doi.org/10.1002/term.119.

[100] Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, et al. Platelet Lysate Consisting of a Natural Repair Proteome Supports Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chromosomal Stability. Cell Transplant 2011;20:797–812. https://doi.org/10.3727/096368910X543376.

[101] Juhl M, Tratwal J, Follin B, Søndergaard RH, Kirchhoff M, Ekblond A, et al. Comparison of clinical grade human platelet lysates for cultivation of mesenchymal

stromal cells from bone marrow and adipose tissue. Scand J Clin Lab Invest 2016;76:93–104. https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1099723.

[102] Hassan G, Bahjat M, Kasem I, Soukkarieh C, Aljamali M. Platelet lysate induces chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. Cell Mol Biol Lett 2018;23:11. https://doi.org/10.1186/s11658-018-0080-6.

[103] Stanco D, Caprara C, Ciardelli G, Mariotta L, Gola M, Minonzio G, et al. Tenogenic differentiation protocol in xenogenic-free media enhances tendon-related marker expression in ASCs. PloS One 2019;14:e0212192. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212192.

[104] Ma J, Both SK, Ji W, Yang F, Prins H-J, Helder MN, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as monocultures or cocultures with human umbilical vein endothelial cells: performance in vitro and in rat cranial defects. J Biomed Mater Res A 2014;102:1026–36. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34775.

[105] Kuterbekov M, Machillot P, Baillet F, Jonas AM, Glinel K, Picart C. Design of experiments to assess the effect of culture parameters on the osteogenic differentiation of human adipose stromal cells. Stem Cell Res Ther 2019;10:256. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1333-7.

[106] Brun J, Abruzzese T, Rolauffs B, Aicher WK, Hart ML. Choice of xenogenic-free expansion media significantly influences the myogenic differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2016;18:344–59. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.11.019.

[107] Søndergaard RH, Follin B, Lund LD, Juhl M, Ekblond A, Kastrup J, et al. Senescence and quiescence in adipose-derived stromal cells: Effects of human platelet lysate, fetal bovine serum and hypoxia. Cytotherapy 2017;19:95–106. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.006.

[108] Griffiths S, Baraniak PR, Copland IB, Nerem RM, McDevitt TC. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. Cytotherapy 2013;15:1469–83. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.020.

[109] Castrén E, Sillat T, Oja S, Noro A, Laitinen A, Konttinen YT, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in two-dimensional and three-dimensional cultures without animal serum. Stem Cell Res Ther 2015;6:167. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0162-6.

[110] Jooybar E, Abdekhodaie MJ, Alvi M, Mousavi A, Karperien M, Dijkstra PJ. An injectable platelet lysate-hyaluronic acid hydrogel supports cellular activities and induces chondrogenesis of encapsulated mesenchymal stem cells. Acta Biomater 2019;83:233–44. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.031.

[111] Awidi A, Ababneh N, Alkilani H, Salah B, Nazzal S, Zoghool M, et al. Evaluation of the growth and osteogenic differentiation of ASCs cultured with PL and seeded on PLGA scaffolds. J Mater Sci Mater Med 2015;26:84. https://doi.org/10.1007/s10856-015-5404-8.

[112] Jafar H, Abuarqoub D, Ababneh N, Hasan M, Al-Sotari S, Aslam N, et al. hPL promotes osteogenic differentiation of stem cells in 3D scaffolds. PloS One 2019;14:e0215667. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215667.

[113] Su Y, Denbeigh JM, Camilleri ET, Riester SM, Parry JA, Wagner ER, et al. Extracellular matrix protein production in human adipose-derived mesenchymal stem cells on three-dimensional polycaprolactone (PCL) scaffolds responds to GDF5 or FGF2. Gene Rep 2018;10:149–56. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.12.004.

[114] Wagner ER, Bravo D, Dadsetan M, Riester SM, Chase S, Westendorf JJ, et al. Ligament Tissue Engineering Using a Novel Porous Polycaprolactone Fumarate Scaffold and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Grown in Platelet Lysate. Tissue Eng Part A 2015;21:2703–13. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0183.

[115] Oliveira SM, Santo VE, Gomes ME, Reis RL, Mano JF. Layer-by-layer assembled cell instructive nanocoatings containing platelet lysate. Biomaterials 2015;48:56–65. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.020.

[116] Fernandez-Rebollo E, Mentrup B, Ebert R, Franzen J, Abagnale G, Sieben T, et al. Human Platelet Lysate versus Fetal Calf Serum: These Supplements Do Not Select for Different Mesenchymal Stromal Cells. Sci Rep 2017;7:5132. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05207-1.

[117] Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2010;12:888–98. https://doi.org/10.3109/14653249.2010.501788.

[118] Russell KA, Gibson TWG, Chong A, Co C, Koch TG. Canine Platelet Lysate Is Inferior to Fetal Bovine Serum for the Isolation and Propagation of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. PloS One 2015;10:e0136621. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136621.

[119] Russell KA, Koch TG. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? Equine Vet J 2016;48:261–4. https://doi.org/10.1111/evj.12440.

[120] Lohmann M, Walenda G, Hemeda H, Joussen S, Drescher W, Jockenhoevel S, et al. Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. PloS One 2012;7:e37839. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037839.

[121] Bernardi M, Agostini F, Chieregato K, Amati E, Durante C, Rassu M, et al. The production method affects the efficacy of platelet derivatives to expand mesenchymal stromal cells in vitro. J Transl Med 2017;15. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1185-9.

[122] Boraldi F, Burns JS, Bartolomeo A, Dominici M, Quaglino D. Mineralization by mesenchymal stromal cells is variously modulated depending on commercial platelet lysate preparations. Cytotherapy 2017. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.11.011.

[123] Abdelrazik H, Spaggiari GM, Chiossone L, Moretta L. Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. Eur J Immunol 2011;41:3281–90. https://doi.org/10.1002/eji.201141542.

[124] Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. J Cell Physiol 2007;211:121–30. https://doi.org/10.1002/jcp.20911.

[125] Copland IB, Garcia MA, Waller EK, Roback JD, Galipeau J. The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy. Biomaterials 2013;34:7840–50. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.050.

[126] Laner-Plamberger S, Lener T, Schmid D, Streif DA, Salzer T, Öller M, et al. Mechanical fibrinogen-depletion supports heparin-free mesenchymal stem cell propagation in human platelet lysate. J Transl Med 2015;13:354. https://doi.org/10.1186/s12967-015-0717-4.

[127] Introna M, Lucchini G, Dander E, Galimberti S, Rovelli A, Balduzzi A, et al. Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant 2014;20:375–81. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.11.033.

[128] Bocelli-Tyndall C, Zajac P, Di Maggio N, Trella E, Benvenuto F, Iezzi G, et al. Fibroblast growth factor 2 and platelet-derived growth factor, but not platelet lysate, induce proliferation-dependent, functional class II major histocompatibility complex antigen in human mesenchymal stem cells. Arthritis Rheum 2010;62:3815–25. https://doi.org/10.1002/art.27736.

[129] Savelli S, Trombi L, D'Alessandro D, Moscato S, Pacini S, Giannotti S, et al. Pooled human serum: A new culture supplement for bioreactor-based cell therapies. Preliminary results. Cytotherapy 2018;20:556–63. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.12.013.

[130] Haack-Sørensen M, Juhl M, Follin B, Harary Søndergaard R, Kirchhoff M, Kastrup J, et al. Development of large-scale manufacturing of adipose-derived stromal cells for clinical applications using bioreactors and human platelet lysate. Scand J Clin Lab Invest 2018;78:293–300. https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1462082.

[131] Russell AL, Lefavor RC, Zubair AC. Characterization and cost-benefit analysis of automated bioreactor-expanded mesenchymal stem cells for clinical applications. Transfusion (Paris) 2018;58:2374–82. https://doi.org/10.1111/trf.14805.

[132] Umeno Y, Okuda A, Kimura G. Proliferative behaviour of fibroblasts in plasma-rich culture medium. J Cell Sci 1989;94 (Pt 3):567–75.

[133] Naveau A, Lataillade J-J, Fournier BP, Couty L, Prat M, Ferre FC, et al. Phenotypic study of human gingival fibroblasts in a medium enriched with platelet lysate. J Periodontol 2011;82:632–41. https://doi.org/10.1902/jop.2010.100179.

[134] Riem Vis PW, Bouten CVC, Sluijter JPG, Pasterkamp G, van Herwerden LA, Kluin J. Platelet-lysate as an autologous alternative for fetal bovine serum in cardiovascular tissue engineering. Tissue Eng Part A 2010;16:1317–27. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0331.

[135] Cipriani V, Ranzato E, Balbo V, Mazzucco L, Cavaletto M, Patrone M. Long-term effect of platelet lysate on primary fibroblasts highlighted with a proteomic approach. J Tissue Eng Regen Med 2009;3:531–8. https://doi.org/10.1002/term.195.

[136] Ranzato E, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT. J Cell Mol Med 2009;13:2030–8. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00467.x.

[137] Thieme D, Reuland L, Lindl T, Kruse F, Fuchsluger T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. J Tissue Eng Regen Med 2017. https://doi.org/10.1002/term.2574.

[138] Tasev D, van Wijhe MH, Weijers EM, van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Long-Term Expansion in Platelet Lysate Increases Growth of Peripheral Blood-Derived Endothelial-Colony Forming Cells and Their Growth Factor-Induced Sprouting Capacity. PloS One 2015;10:e0129935. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129935.

[139] Ruggiu A, Ulivi V, Sanguineti F, Cancedda R, Descalzi F. The effect of Platelet Lysate on osteoblast proliferation associated with a transient increase of the inflammatory response in bone regeneration. Biomaterials 2013;34:9318–30. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.018.

[140] Ranzato E, Balbo V, Boccafoschi F, Mazzucco L, Burlando B. Scratch wound closure of C2C12 mouse myoblasts is enhanced by human platelet lysate. Cell Biol Int 2009;33:911–7. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2009.06.017.

[141] Berger DR, Centeno CJ, Steinmetz NJ. Platelet lysates from aged donors promote human tenocyte proliferation and migration in a concentration-dependent manner. Bone Jt Res 2019;8:32–40. https://doi.org/10.1302/2046-3758.81.BJR-2018-0164.R1.

[142] Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, Burlando B. Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. Br J Dermatol 2008;159:537–45. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08699.x.

[143] Lee Y-L, Lee L-W, Su C-Y, Hsiao G, Yang Y-Y, Leu S-J, et al. Virally inactivated human platelet concentrate lysate induces regulatory T cells and immunosuppressive effect in a murine asthma model. Transfusion (Paris) 2013;53:1918–28. https://doi.org/10.1111/trf.12068.

[144] Wagner ER, Parry J, Dadsetan M, Bravo D, Riester SM, van Wijnen AJ, et al. Chondrocyte Attachment, Proliferation, and Differentiation on Three-Dimensional Polycaprolactone Fumarate Scaffolds. Tissue Eng Part A 2017;23:622–9. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0341.

[145] Pereira RC, Scaranari M, Benelli R, Strada P, Reis RL, Cancedda R, et al. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution. Tissue Eng Part A 2013;19:1476–88. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0225.

[146] Choi YC, Morris GM, Sokoloff L. Effect of platelet lysate on growth and sulfated glycosaminoglycan synthesis in articular chondrocyte cultures. Arthritis Rheum 1980;23:220–4.

[147] Naskou MC, Norton NA, Copland IB, Galipeau J, Peroni JF. Innate immune responses of equine monocytes cultured in equine platelet lysate. Vet Immunol Immunopathol 2018;195:65–71. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.11.005.

[148] Sovkova V, Vocetkova K, Rampichova M, Mickova A, Buzgo M, Lukasova V, et al. Platelet lysate as a serum replacement for skin cell culture on biomimetic PCL nanofibers. Platelets 2017:1–11. https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1316838.

[149] Soffer E, Ouhayoun J-P, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. Clin Oral Implants Res 2004;15:581–8. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01063.x.

[150] Laner-Plamberger S, Oeller M, Mrazek C, Hartl A, Sonderegger A, Rohde E, et al. Upregulation of mitotic bookmarking factors during enhanced proliferation of human stromal cells in human platelet lysate. J Transl Med 2019;17:432. https://doi.org/10.1186/s12967-019-02183-0.

[151] Suliman S, Ali HRW, Karlsen TA, Amiaud J, Mohamed-Ahmed S, Layrolle P, et al. Impact of humanised isolation and culture conditions on stemness and osteogenic potential of bone marrow derived mesenchymal stromal cells. Sci Rep 2019;9:16031. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52442-9.

[152] Kakudo N, Morimoto N, Ma Y, Kusumoto K. Differences between the Proliferative Effects of Human Platelet Lysate and Fetal Bovine Serum on Human Adipose-Derived Stem Cells. Cells 2019;8. https://doi.org/10.3390/cells8101218.

[153] Businaro R, Scaccia E, Bordin A, Pagano F, Corsi M, Siciliano C, et al. Platelet Lysate-Derived Neuropeptide y Influences Migration and Angiogenesis of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. Sci Rep 2018;8:14365. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32623-8.

[154] Losi P, Barsotti MC, Foffa I, Buscemi M, De Almeida CV, Fabbri M, et al. In vitro human cord blood platelet lysate characterisation with potential application in wound healing. Int Wound J 2020;17:65–72. https://doi.org/10.1111/iwj.13233.

[155] Riem Vis PW, Sluijter JPG, Soekhradj-Soechit RS, van Herwerden LA, Kluin J, Bouten CVC. Sequential use of human-derived medium supplements favours cardiovascular tissue engineering. J Cell Mol Med 2012;16:730–9. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01351.x.

[156] Reinisch A, Strunk D. Isolation and animal serum free expansion of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and endothelial colony forming progenitor cells (ECFCs). J Vis Exp JoVE 2009. https://doi.org/10.3791/1525.

[157] Denecke B, Horsch LD, Radtke S, Fischer JC, Horn PA, Giebel B. Human endothelial colony-forming cells expanded with an improved protocol are a useful endothelial cell source for scaffold-based tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med 2015;9:E84-97. https://doi.org/10.1002/term.1673.

[158] Baik SY, Lim YA, Kang SJ, Ahn SH, Lee WG, Kim CH. Effects of platelet lysate preparations on the proliferation of HaCaT cells. Ann Lab Med 2014;34:43–50. https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.1.43.

[159] Krämer DK, Bouzakri K, Holmqvist O, Al-Khalili L, Krook A. Effect of serum replacement with plysate on cell growth and metabolismin primary cultures of human skeletal muscle. Cytotechnology 2005;48:89–95. https://doi.org/10.1007/s10616-005-4074-7.

[160] Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. Cytotherapy 2012;14:540–54. https://doi.org/10.3109/14653249.2012.655420.

[161] Bieback K. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. Transfus Med Hemotherapy 2013;40:326–35. https://doi.org/10.1159/000354061.

[162] Heathman TRJ, Stolzing A, Fabian C, Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, et al. Scalability and process transfer of mesenchymal stromal cell production from monolayer to microcarrier culture using human platelet lysate. Cytotherapy 2016;18:523–35. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.01.007.

[163] Fortunato TM, Beltrami C, Emanueli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. Sci Rep 2016;6:25326. https://doi.org/10.1038/srep25326.

[164] Mori M, Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Sandri G, Riva F, et al. Calcium alginate particles for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride in chronic skin ulcers. Int J Pharm 2014;461:505–13. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.020.

[165] Babo PS, Reis RL, Gomes ME. Production and characterization of hyaluronic acid microparticles for the controlled delivery of growth factors using a spray/dehydration method. J Biomater Appl 2016;31:693–707. https://doi.org/10.1177/0885328216669475.

[166] Almeida LDF, Babo PS, Silva CR, Rodrigues MT, Hebling J, Reis RL, et al. Hyaluronic acid hydrogels incorporating platelet lysate enhance human pulp cell proliferation and differentiation. J Mater Sci Mater Med 2018;29:88. https://doi.org/10.1007/s10856-018-6088-7.

[167] Jooybar E, Abdekhodaie MJ, Karperien M, Mousavi A, Alvi M, Dijkstra PJ. Developing hyaluronic acid microgels for sustained delivery of platelet lysate for tissue engineering applications. Int J Biol Macromol 2020;144:837–46. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.036.

[168] Lima AC, Mano JF, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. Fast and mild strategy, using superhydrophobic surfaces, to produce collagen/platelet lysate gel beads for skin regeneration. Stem Cell Rev 2015;11:161–79. https://doi.org/10.1007/s12015-014-9548-6.

[169] Silva ED, Babo PS, Costa-Almeida R, Domingues RMA, Mendes BB, Paz E, et al. Multifunctional magnetic-responsive hydrogels to engineer tendon-to-bone interface. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med 2017. https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.002.

[170] Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Cervio M, et al. Platelet lysate embedded scaffolds for skin regeneration. Expert Opin Drug Deliv 2015;12:525–45. https://doi.org/10.1517/17425247.2015.961421.

[171] Rossi S, Faccendini A, Bonferoni MC, Ferrari F, Sandri G, Del Fante C, et al. “Sponge-like” dressings based on biopolymers for the delivery of platelet lysate to skin chronic wounds. Int J Pharm 2013;440:207–15. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.056.

[172] Mori M, Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Sandri G, Riva F, et al. Sponge-Like Dressings Based on the Association of Chitosan and Sericin for the Treatment of Chronic Skin Ulcers. II. Loading of the Hemoderivative Platelet Lysate. J Pharm Sci 2016;105:1188–95. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.043.

[173] Fontana F, Mori M, Riva F, Mäkilä E, Liu D, Salonen J, et al. Platelet Lysate-Modified Porous Silicon Microparticles for Enhanced Cell Proliferation in Wound Healing Applications. ACS Appl Mater Interfaces 2016;8:988–96. https://doi.org/10.1021/acsami.5b10950.

[174] Dellera E, Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Del Fante C, et al. Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing. Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV 2014;88:643–50. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.07.015.

[175] Rossi S, Mori M, Vigani B, Bonferoni MC, Sandri G, Riva F, et al. A novel dressing for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride to chronic skin ulcers: Hyaluronic acid particles in alginate matrices. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci 2018;118:87–95. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.024.

[176] Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Del Fante C, et al. Platelet lysate formulations based on mucoadhesive polymers for the treatment of corneal lesions. J Pharm Pharmacol 2011;63:189–98. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01208.x.

[177] Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Del Fante C, et al. Thermosensitive eyedrops containing platelet lysate for the treatment of corneal ulcers. Int J Pharm 2012;426:1–6. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.059.

[178] Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Delfino A, Riva F, Icaro Cornaglia A, et al. Platelet lysate and chondroitin sulfate loaded contact lenses to heal corneal lesions. Int J Pharm 2016;509:188–96. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.045.

[179] Costa-Almeida R, Calejo I, Altieri R, Domingues RMA, Giordano E, Reis RL, et al. Exploring platelet lysate hydrogel-coated suture threads as biofunctional composite living fibers for cell delivery in tissue repair. Biomed Mater Bristol Engl 2019;14:034104. https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab0de6.

[180] Ranzato E, Martinotti S, Volante A, Mazzucco L, Burlando B. Platelet lysate modulates MMP-2 and MMP-9 expression, matrix deposition and cell-to-matrix adhesion in keratinocytes and fibroblasts. Exp Dermatol 2011;20:308–13. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01173.x.

[181] El Backly R, Ulivi V, Tonachini L, Cancedda R, Descalzi F, Mastrogiacomo M. Platelet lysate induces in vitro wound healing of human keratinocytes associated with a strong proinflammatory response. Tissue Eng Part A 2011;17:1787–800. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0729.

[182] Ulivi V, Tasso R, Cancedda R, Descalzi F. Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype. Stem Cells Dev 2014;23:1858–69. https://doi.org/10.1089/scd.2013.0567.

[183] Barsotti MC, Chiara Barsotti M, Losi P, Briganti E, Sanguinetti E, Magera A, et al. Effect of platelet lysate on human cells involved in different phases of wound healing. PloS One 2013;8:e84753. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084753.

[184] Klatte-Schulz F, Schmidt T, Uckert M, Scheffler S, Kalus U, Rojewski M, et al. Comparative Analysis of Different Platelet Lysates and Platelet Rich Preparations to Stimulate Tendon Cell Biology: An In Vitro Study. Int J Mol Sci 2018;19. https://doi.org/10.3390/ijms19010212.

[185] Robinson ST, Douglas AM, Chadid T, Kuo K, Rajabalan A, Li H, et al. A novel platelet lysate hydrogel for endothelial cell and mesenchymal stem cell-directed neovascularization. Acta Biomater 2016;36:86–98. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.002.

[186] Leotot J, Coquelin L, Bodivit G, Bierling P, Hernigou P, Rouard H, et al. Platelet lysate coating on scaffolds directly and indirectly enhances cell migration, improving bone and blood vessel formation. Acta Biomater 2013;9:6630–40. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.003.

[187] Brewster L, Robinson S, Wang R, Griffiths S, Li H, Peister A, et al. Expansion and angiogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with critical limb ischemia. J Vasc Surg 2017;65:826-838.e1. https://doi.org/10.1016/j.jvs.2015.02.061.

[188] Oliveira SM, Pirraco RP, Marques AP, Santo VE, Gomes ME, Reis RL, et al. Platelet lysate-based pro-angiogenic nanocoatings. Acta Biomater 2016;32:129–37. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.028.

[189] Sergeeva NS, Shanskii YD, Sviridova IK, Karalkin PA, Kirsanova VA, Akhmedova SA, et al. Analysis of Reparative Activity of Platelet Lysate: Effect on Cell Monolayer Recovery In Vitro and Skin Wound Healing In Vivo. Bull Exp Biol Med 2016;162:138–45. https://doi.org/10.1007/s10517-016-3563-3.

[190] Ito R, Morimoto N, Pham LH, Taira T, Kawai K, Suzuki S. Efficacy of the controlled release of concentrated platelet lysate from a collagen/gelatin scaffold for dermis-like tissue regeneration. Tissue Eng Part A 2013;19:1398–405. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0375.

[191] Notodihardjo SC, Morimoto N, Kakudo N, Mitsui T, Le TM, Tabata Y, et al. Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing. Regen Ther 2019;10:1–9. https://doi.org/10.1016/j.reth.2018.10.003.

[192] Notodihardjo SC, Morimoto N, Kakudo N, Mitsui T, Le TM, Tabata Y, et al. Efficacy of Gelatin Hydrogel Impregnated With Concentrated Platelet Lysate in Murine Wound Healing. J Surg Res 2019;234:190–201. https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.09.037.

[193] Tenci M, Rossi S, Bonferoni MC, Sandri G, Boselli C, Di Lorenzo A, et al. Particulate systems based on pectin/chitosan association for the delivery of manuka honey components and platelet lysate in chronic skin ulcers. Int J Pharm 2016;509:59–70. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.035.

[194] Ozturk S, Sahin C, Tas AC, Muftuoglu T, Karagoz H. Effect of Allogeneic Platelet Lysate and Cyanoacrylate Tissue Glue on the Fibrovascularization of the Porous Polyethylene Implant. J Craniofac Surg 2016;27:253–7. https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000002303.

[195] Zhang Y, Ying G, Ren C, Jizhang Y, Brogan D, Liu Z, et al. Administration of human platelet-rich plasma reduces infarction volume and improves motor function in adult rats with focal ischemic stroke. Brain Res 2015;1594:267–73. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.035.

[196] Yamauchi T, Saito H, Ito M, Shichinohe H, Houkin K, Kuroda S. Platelet lysate and granulocyte-colony stimulating factor serve safe and accelerated expansion of human bone marrow stromal cells for stroke therapy. Transl Stroke Res 2014;5:701–10. https://doi.org/10.1007/s12975-014-0360-z.

[197] Chou M-L, Wu J-W, Gouel F, Jonneaux A, Timmerman K, Renn T-Y, et al. Tailor-made purified human platelet lysate concentrated in neurotrophins for treatment of Parkinson's disease. Biomaterials 2017;142:77–89. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.018.

[198] Soffer E, Ouhayoun JP, Meunier A, Anagnostou F. Effects of autologous platelet lysates on ceramic particle resorption and new bone formation in critical size defects: The role of anatomical sites. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006;79B:86–94. https://doi.org/10.1002/jbm.b.30516.

[199] Tyrnenopoulou P, Diakakis N, Karayannopoulou M, Savvas I, Koliakos G. Evaluation of intra-articular injection of autologous platelet lysate (PL) in horses with osteoarthritis of the distal interphalangeal joint. Vet Q 2016;36:56–62. https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1141257.

[200] Babo PS, Cai X, Plachokova AS, Reis RL, Jansen J, Gomes ME, et al. Evaluation of a platelet lysate bilayered system for periodontal regeneration in a rat intrabony three-

wall periodontal defect. J Tissue Eng Regen Med 2017. https://doi.org/10.1002/term.2535.

[201] Babo PS, Cai X, Plachokova AS, Reis RL, Jansen JA, Gomes ME, et al. The Role of a Platelet Lysate-Based Compartmentalized System as a Carrier of Cells and Platelet-Origin Cytokines for Periodontal Tissue Regeneration. Tissue Eng Part A 2016;22:1164–75. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0226.

[202] Şeker Ş, Elçin AE, Elçin YM. Macroporous elastic cryogels based on platelet lysate and oxidized dextran as tissue engineering scaffold: In vitro and in vivo evaluations. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2020;110:110703. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110703.

[203] Yousefi-Ahmadipour A, Ebrahimi-Barough S, Niknia S, Allahverdi A, Mirzahosseini-Pourranjbar A, Tashakori M, et al. Therapeutic effects of combination of platelet lysate and sulfasalazine administration in TNBS-induced colitis in rat. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother 2020;125:109949. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109949.

[204] Bolte J, Vater C, Culla AC, Ahlfeld T, Nowotny J, Kasten P, et al. Two-step stem cell therapy improves bone regeneration compared to concentrated bone marrow therapy. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc 2019;37:1318–28. https://doi.org/10.1002/jor.24215.

[205] Gupta P, Hall GN, Geris L, Luyten FP, Papantoniou I. Human Platelet Lysate Improves Bone Forming Potential of Human Progenitor Cells Expanded in Microcarrier-Based Dynamic Culture. Stem Cells Transl Med 2019;8:810–21. https://doi.org/10.1002/sctm.18-0216.

[206] Huang C-T, Chu H-S, Hung K-C, Chen LW, Chen M-Y, Hu F-R, et al. The effect of human platelet lysate on corneal nerve regeneration. Br J Ophthalmol 2019. https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-314408.

[207] Najafi E, Arash Anoushiravani A, Kalafi N, Mohajerani HR, Moradabadi AR, Mortezaeei S, et al. Application of platelet-rich plasma and platelet lysate in the treatment of experimental lymphocutaneous sporotrichosi. Curr Med Mycol 2019;5:7–12. https://doi.org/10.18502/cmm.5.3.1740.

[208] Silva-Cote I, Cruz-Barrera M, Cañas-Arboleda M, Correa-Araujo L, Méndez L, Jagielska J, et al. Strategy for the Generation of Engineered Bone Constructs Based on Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Expanded with Human Platelet Lysate. Stem Cells Int 2019;2019:7198215. https://doi.org/10.1155/2019/7198215.

[209] Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Dellera E, Invernizzi A, Boselli C, et al. Association of Alpha Tocopherol and Ag Sulfadiazine Chitosan Oleate Nanocarriers in Bioactive Dressings Supporting Platelet Lysate Application to Skin Wounds. Mar Drugs 2018;16. https://doi.org/10.3390/md16020056.

[210] Chen LW, Huang C-J, Tu W-H, Lu C-J, Sun Y-C, Lin S-Y, et al. The corneal epitheliotrophic abilities of lyophilized powder form human platelet lysates. PloS One 2018;13:e0194345. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194345.

[211] Huang C-J, Sun Y-C, Christopher K, Pai AS-I, Lu C-J, Hu F-R, et al. Comparison of corneal epitheliotrophic capacities among human platelet lysates and other blood derivatives. PloS One 2017;12:e0171008. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171008.

[212] Babo PS, Carvalho PP, Santo VE, Faria S, Gomes ME, Reis RL. Assessment of bone healing ability of calcium phosphate cements loaded with platelet lysate in rat calvarial defects. J Biomater Appl 2016;31:637–49. https://doi.org/10.1177/0885328216669474.

[213] Zallio F, Mazzucco L, Monaco F, Astori MR, Passera R, Drago G, et al. A Single-Center Pilot Prospective Study of Topical Application of Platelet-Derived Eye Drops for Patients with Ocular Chronic Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant 2016;22:1664–70. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.05.023.

[214] Valentini CG, Nuzzolo ER, Orlando N, Metafuni E, Bianchi M, Chiusolo P, et al. Cytokine profile of autologous platelet-derived eye drops in patients with ocular chronic graft-versus-host disease. Vox Sang 2016;110:189–92. https://doi.org/10.1111/vox.12325.

[215] Pezzotta S, Del Fante C, Scudeller L, Cervio M, Antoniazzi ER, Perotti C. Autologous platelet lysate for treatment of refractory ocular GVHD. Bone Marrow Transplant 2012;47:1558–63. https://doi.org/10.1038/bmt.2012.64.

[216] Fea AM, Aragno V, Testa V, Machetta F, Parisi S, D'Antico S, et al. The Effect of Autologous Platelet Lysate Eye Drops: An In Vivo Confocal Microscopy Study. BioMed Res Int 2016;2016:8406832. https://doi.org/10.1155/2016/8406832.

[217] Geremicca W, Fonte C, Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. Blood Transfus Trasfus Sangue 2010;8:107–12. https://doi.org/10.2450/2009.0091-09.

[218] Pezzotta S, Del Fante C, Scudeller L, Rossi GC, Perotti C, Bianchi PE, et al. Long-term safety and efficacy of autologous platelet lysate drops for treatment of ocular GvHD. Bone Marrow Transplant 2017;52:101–6. https://doi.org/10.1038/bmt.2016.221.

[219] Giannaccare G, Versura P, Buzzi M, Primavera L, Pellegrini M, Campos EC. Blood derived eye drops for the treatment of cornea and ocular surface diseases. Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis 2017;56:595–604. https://doi.org/10.1016/j.transci.2017.07.023.

[220] Al-Ajlouni J, Awidi A, Samara O, Al-Najar M, Tarwanah E, Saleh M, et al. Safety and Efficacy of Autologous Intra-articular Platelet Lysates in Early and Intermediate Knee Osteoarthrosis in Humans: A Prospective Open-Label Study. Clin J Sport Med Off J Can Acad Sport Med 2015;25:524–8. https://doi.org/10.1097/JSM.0000000000000166.

[221] Rizzo C, Vetro R, Vetro A, Mantia R, Iovane A, Di Gesù M, et al. The role of platelet gel in osteoarticular injuries of young and old patients. Immun Ageing A 2014;11:21. https://doi.org/10.1186/s12979-014-0021-9.

[222] Labibzadeh N, Emadedin M, Fazeli R, Mohseni F, Hosseini SE, Moghadasali R, et al. Mesenchymal Stromal Cells Implantation in Combination with Platelet Lysate Product Is Safe for Reconstruction of Human Long Bone Nonunion. Cell J 2016;18:302–9.

[223] Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M, Robinson B, Freeman M, Marasco W. Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. Curr Stem Cell Res Ther 2010;5:81–93. https://doi.org/10.2174/157488810790442796.

[224] Tan X, Ju H, Yan W, Jiang H, Su J, Dong H, et al. Autologous platelet lysate local injections for the treatment of refractory lateral epicondylitis. J Orthop Surg 2016;11:17. https://doi.org/10.1186/s13018-016-0349-2.

[225] Scudeller L, Del Fante C, Perotti C, Pavesi CF, Coscia D, Scotti V, et al. N of 1, two contemporary arm, randomised controlled clinical trial for bilateral epicondylitis: a new study design. BMJ 2011;343:d7653.

[226] Del Fante C, Perotti C, Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, Ferrari F, et al. Platelet lysate mucohadesive formulation to treat oral mucositis in graft versus host disease patients: a new therapeutic approach. AAPS PharmSciTech 2011;12:893–9. https://doi.org/10.1208/s12249-011-9649-3.

[227] Stacey M, Mata S, Trengove N, Mather C. Randomised Double-blind Placebo Controlled Trial of Topical Autologous Platelet Lysate in Venous Ulcer Healing. Eur J Vasc Endovasc Surg 2000;20:296–301. https://doi.org/10.1053/ejvs.2000.1134.

[228] Centeno C, Markle J, Dodson E, Stemper I, Hyzy M, Williams C, et al. The use of lumbar epidural injection of platelet lysate for treatment of radicular pain. J Exp Orthop 2017;4:38. https://doi.org/10.1186/s40634-017-0113-5.

[229] Cole JP, Cole MA, Insalaco C, Cervelli V, Gentile P. Alopecia and platelet-derived therapies. Stem Cell Investig 2017;4. https://doi.org/10.21037/sci.2017.11.01.

[230] Dastan M, Najafzadeh N, Abedelahi A, Sarvi M, Niapour A. Human platelet lysate versus minoxidil stimulates hair growth by activating anagen promoting signaling pathways. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother 2016;84:979–86. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.019.

[231] Zhu M, Kong D, Tian R, Pang M, Mo M, Chen Y, et al. Platelet sonicates activate hair follicle stem cells and mediate enhanced hair follicle regeneration. J Cell Mol Med 2020;24:1786–94. https://doi.org/10.1111/jcmm.14873.

[232] Protogerou V, Beshari SE, Michalopoulos E, Mallis P, Chrysikos D, Samolis AA, et al. The Combined Use of Stem Cells and Platelet Lysate Plasma for the Treatment of Erectile Dysfunction: A Pilot Study-6 Months Results. Med Basel Switz 2020;7. https://doi.org/10.3390/medicines7030014.

[233] Rawson B. Platelet-Rich Plasma and Epidural Platelet Lysate: Novel Treatment for Lumbar Disk Herniation. J Am Osteopath Assoc 2020;120:201–7. https://doi.org/10.7556/jaoa.2020.032.

[234] Ahmed EM, Ali S, Gaafar SM, Rashed LM, Fayed HL. Evaluation of topical human platelet lysate versus topical clobetasol in management of methotrexate-induced oral ulceration in rheumatoid arthritis patients: Randomized-controlled clinical trial. Int Immunopharmacol 2019;73:389–94. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.028.

[235] Protogerou V, Michalopoulos E, Mallis P, Gontika I, Dimou Z, Liakouras C, et al. Administration of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet Lysate in Erectile Dysfunction: A Single Center Pilot Study. Bioeng Basel Switz 2019;6. https://doi.org/10.3390/bioengineering6010021.

[236] Gottipamula S, Sharma A, Krishnamurthy S, Majumdar AS, Seetharam RN. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Biotechnol Lett 2012;34:1367–74. https://doi.org/10.1007/s10529-012-0893-8.

[237] Altaie A, Owston H, Jones E. Use of platelet lysate for bone regeneration - are we ready for clinical translation? World J Stem Cells 2016;8:47–55. https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i2.47.

[238] Warnke PH, Humpe A, Strunk D, Stephens S, Warnke F, Wiltfang J, et al. A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies. J Cranio-Maxillo-Fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-Fac Surg 2013;41:153–61. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2012.07.003.

[239] Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. J R Soc Interface 2007;4:999–1030. https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0220.

[240] Schmoekel H, Schense JC, Weber FE, Grätz KW, Gnägi D, Müller R, et al. Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices. J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc 2004;22:376–81. https://doi.org/10.1016/S0736-0266(03)00188-8.

[241] Rai B, Teoh SH, Hutmacher DW, Cao T, Ho KH. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. Biomaterials 2005;26:3739–48. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.052.

[242] Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. Adv Drug Deliv Rev 2007;59:207–33. https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.012.

[243] Duarte ARC, Santo VE, Alves A, Silva SS, Moreira-Silva J, Silva TH, et al. Unleashing the potential of supercritical fluids for polymer processing in tissue engineering and regenerative medicine. J Supercrit Fluids 2013;79:177–85. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.004.

[244] Gomes S, Leonor IB, Mano JF, Reis RL, Kaplan DL. Natural and Genetically Engineered Proteins for Tissue Engineering. Prog Polym Sci 2012;37:1–17. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.07.003.

[245] Bhang SH, Park J, Yang HS, Shin J, Kim B-S. Platelet-rich plasma enhances the dermal regeneration efficacy of human adipose-derived stromal cells administered to skin wounds. Cell Transplant 2013;22:437–45. https://doi.org/10.3727/096368912X656162.

[246] Van Pham P, Bui KH-T, Ngo DQ, Vu NB, Truong NH, Phan NL-C, et al. Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage. Stem Cell Res Ther 2013;4:91. https://doi.org/10.1186/scrt277.

[247] Jang S-J, Kim J-D, Cha S-S. Platelet-rich plasma (PRP) injections as an effective treatment for early osteoarthritis. Eur J Orthop Surg Traumatol Orthop Traumatol 2013;23:573–80. https://doi.org/10.1007/s00590-012-1037-5.

[248] Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli ML, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA 2015;23:2459–74. https://doi.org/10.1007/s00167-013-2743-1.

[249] Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? Clin Oral Investig 2017;21:2619–27. https://doi.org/10.1007/s00784-017-2063-9.

[250] Villa MM, Wang L, Huang J, Rowe DW, Wei M. Improving the permeability of lyophilized collagen-hydroxyapatite scaffolds for cell-based bone regeneration with a gelatin porogen: PERMEABILITY IMPROVEMENT OF COLLAGEN-HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2016;104:1580–90. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33387.

Deuxième partie : Conception d'un biomatériau à base de lysat plaquettaire par séchage au CO_2 supercritique

I. Le CO_2 supercritique

Les procédés permettant de répondre à l'objectif précédemment énoncé en fin de première partie sont rares car le séchage d'un hydrogel s'accompagne souvent d'une perte de son volume. Or la conservation d'un réseau poreux interconnecté au sein du biomatériau final est essentielle à la colonisation par les cellules de l'hôte et à la pénétration et la diffusion des fluides biologiques.

Le « séchage au CO_2 supercritique » permet de conserver voire de contrôler la porosité d'une telle structure. L'état supercritique correspond au 4ème état de la matière, qui vient s'ajouter aux trois autres états thermodynamiques : solide, liquide et gazeux. Les changements d'états dépendent de la pression et de la température. Il existe pour chaque corps, des conditions particulières de température et de pression pour lesquelles les phases liquide et gazeuse ont la même densité : c'est ce qu'on appelle le point critique [1,2]. Il correspond au point de la courbe température/pression où se termine le tracé d'équilibre liquide-gaz (Figures 13 et 14). A ce stade, les propriétés des deux phases sont similaires. L'état supercritique est atteint au-delà de ce point. Dans le cas du CO_2, cet état est atteint au-delà d'une pression de 74 Bar et d'une température de 31°C. Ainsi, le comportement du fluide (CO_2) est à la croisée entre celui d'un gaz et celui d'un liquide avec un coefficient de pénétration particulièrement élevé.

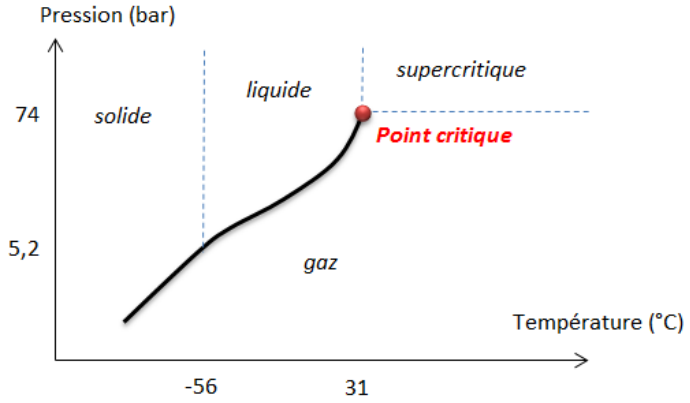

Figure 13 : Diagramme température/pression du dioxyde de carbone indiquant ses différents états selon les conditions de température et de pression [1]. Le point rouge indique le point critique, extrémité de la courbe où se termine le tracé d'équilibre liquide-gaz.

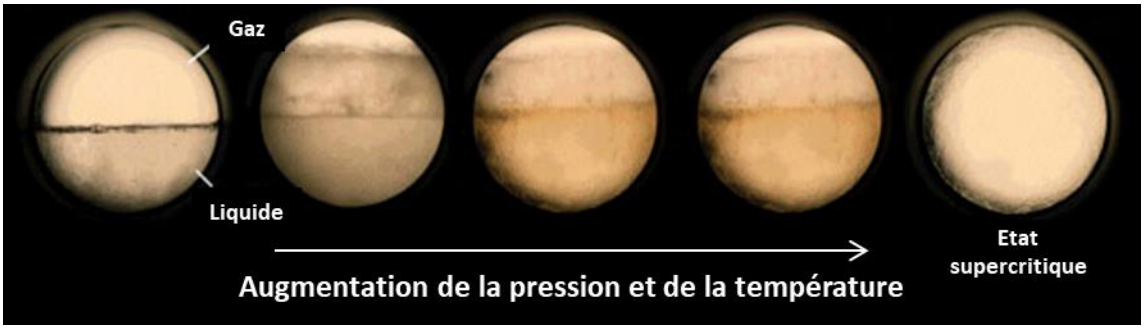

Figure 14 : Changements d'états du dioxyde de carbone visibles dans un sécheur à CO_2 supercritique lors d'une augmentation de la pression et de la température.

1. Applications médicales

A l'état supercritique, le CO_2 possède de remarquables propriétés de solubilité de substances organiques. De plus, contrairement à d'autres solvants organiques non polaires, il est non toxique et non inflammable, ce qui le rend très prisé pour de nombreuses applications [1,2]. Il peut servir comme solvant pour l'extraction de composés de bas poids moléculaire (type acides gras, huiles essentielles, hydrocarbures et petits polymères) [3]. En présence d'eau, le CO_2 supercritique est utilisé également comme agent réactionnel capable d'induire des phénomènes de dissolution/reprécipitation qui permettent la précipitation de nanocristaux apatitiques hautement réactifs à la surface de céramiques [4] et, depuis le milieu des années

1990 [5,6], comme procédé de mise en forme capable d'induire la formation à partir d'un gel – comme celui de lysat plaquettaire – d'une mousse sèche [1,7]. Les organogels, qui sont composés d'un réseau fibreux contenant un liquide organique comme l'éthanol ou l'acétone [8], sont les plus à même d'être séchés par CO_2 supercritique du fait de la miscibilité du solvant organique dans le dioxyde de carbone. C'est la raison pour laquelle, lorsqu'il s'agit d'hydrogels, la phase aqueuse doit être substituée par un de ces solvants pour retrouver les conditions d'un organogel.

La mousse obtenue à l'issue du procédé de séchage présente un réseau poreux percolant dont la porosité est modulable en modifiant les conditions de séchage sous dioxyde de carbone. En effet, les paramètres du procédé qui influencent les propriétés physico-chimiques et la morphologie du matériau sont le temps, la température, la pression d'incubation [5], et la vitesse de dépressurisation : une dépressurisation rapide permet d'augmenter la porosité au sein du matériau [9]. Cela est lié à l'instabilité thermodynamique du CO_2 en cas de chute de pression qui conduit à une augmentation des phénomènes dits de nucléation à l'intérieur de la matrice [6].

Les limites du recours au CO_2 supercritique pour sécher les hydrogels de lysat plaquettaire sont toutefois liées à la nécessité de substituer la phase aqueuse par un solvant organique miscible au CO_2 en effectuant des trempages en bains de solvants (acétone ou éthanol par exemple) [1] avec de possibles conséquences sur le réseau de fibrine.

Hile et *al*. ont décrit dans la littérature lors du séchage au CO_2 supercritique d'hydrogels enrichis en protéines comme le FGF2 une précipitation de ces molécules à la surface des fibres [10], d'autant plus importante si la dépressurisation est rapide [11]. La rétention des protéines dans la mousse autorisera leur libération une fois la structure implantée dans un

milieu [10]. Leur libération est alors prolongée dans le temps contrairement aux profils de libération retrouvés avec des mousses obtenues par lessivage d'agents porogènes solubles [10]. Cette propriété rend attractif le séchage d'un hydrogel de lysat plaquettaire riche en facteurs de croissance [12] lorsqu'une action prolongée est recherchée.

2. Fibrine et CO_2 supercritique

Les capacités de séchage du dioxyde de carbone à l'état supercritique permettent d'imaginer un réseau tridimensionnel de fibrine d'origine naturelle, poreux et facilement manipulable, qui puisse servir de matrice à la colonisation cellulaire et vasculaire dans le cadre de la régénération tissulaire au sens large. Ce biomatériau pourra comporter une double fonction thérapeutique (en favorisant la cicatrisation et la régénération des tissus) et préventive (par une action sur les complications post-opératoires en limitant la chronicisation des plaies et les surinfections qui pourraient en découler).

II. Mise au point du procédé de séchage et conception des biomatériaux

1. Constitution des hydrogels de lysat plaquettaire

Note : l'optimisation de la formulation et la caractérisation biologique des gels a été réalisée au préalable lors de mon stage de Master 2 au laboratoire StromaLab (Toulouse, France) sous la direction du Docteur Valérie PLANAT-BENARD, du Professeur Philippe KEMOUN et du Docteur Paul MONSARRAT. Ces expérimentations ne faisant pas partie de la mise au

point du procédé de séchage à proprement parler, elles ne seront que succinctement décrites ici et seront accompagnées de la référence du poster présenté en 2017 à l'issue du Master 2 au Congrès International de la Société Francophone de Biomatériaux Dentaires [13].

Des matrices fibreuses de fibrine peuvent être obtenues en laboratoire par l'utilisation de molécules favorisant la polymérisation du fibrinogène. Plusieurs agents peuvent être associés pour initier la formation du réseau de fibres, accélérer la coagulation ou encore stabiliser les polymères de fibrine obtenus. Ainsi, le dérivé plaquettaire initial (ici le lysat plaquettaire est utilisé, mais cela fonctionnerait également avec du PRP par exemple ou même du fibrinogène soluble) peut être combiné avec au moins un élément choisi parmi :

- un initiateur de la polymérisation (exemples : le $CaCl_2$, la thrombine [14–20], la genepine [21]),
- un facteur favorisant la polymérisation (exemples : le facteur XIII [20], le 1-éthyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide [22]),
- un stabilisateur de la coagulation (exemples : l'acide tranexamique qui est un stabilisateur de la coagulation par action anti-fibrinolytique, l'acide amino-caproique [15] qui est un stabilisateur par action anti-dégradation du réseau de fibres, la fibronectine [20] qui est un stabilisateur de la coagulation par adhésion des cellules à la matrice extracellulaire),
- un agent permettant le maintien de l'osmolarité (exemple : le NaCl),
- un agent favorisant les liaisons dans le réseau (exemple : le N-hydroxysuccinimide [22]).

Nous avons constitué des hydrogels à partir de lysats plaquettaires humains (hLP) obtenus soit auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS) [23], soit auprès de la société MACO PHARMA (produit MultiPL' 100®, MACO PHARMA, Tourcoing, France).

Quatre constituants, utilisés à différentes concentrations, entrent dans la constitution de ces gels :

- du lysat plaquettaire, naturellement riche en facteurs de croissance ;
- du chlorure de calcium utilisé sous forme de solution de $CaCl_2$ à 10% ($CaCl_2$ 1g/10mL, solution injectable en ampoule, Renaudin®) capable grâce à son contenu en calcium d'initier la polymérisation du réseau de fibres dans le gel ;
- du chlorure de sodium utilisé sous forme de solution de NaCl à 0,9% (Chlorure de Sodium PROAMP 0,9%, ampoules 20mL, Aguettant®), solution isotonique permettant également d'augmenter la porosité de l'hydrogel ;
- et de l'acide tranexamique utilisé sous forme de solution à 10% (Exacyl, solution buvable à 1g/10mL, Sanofi-Aventis®) qui est un agent stabilisateur de la coagulation et un inhibiteur de l'action fibrinolytique de la plasmine plasmatique [24]).

Grâce à une méthodologie statistique de « *mixture experiment* » [25], nous avons étudié l'influence des différents constituants et de leur proportion sur la vitesse de polymérisation. 21 essais ont été réalisés en faisant varier le taux des différents constituants. Le suivi de la polymérisation a été mené par mesure de la densité optique à 640nm du gel dans un lecteur de plaque universel (Varioskan, ThermoFisher®) à une température de 37°C. Lors de la transition sol-gel, la formation des liaisons covalentes entre les extrémités N et C-terminales de deux monomères de fibrines engendre une modification de la turbidité du milieu [26]. De Cristofaro et *al.* ont montré que l'évolution de la turbidité était quantifiable par suivi de l'absorbance à une longueur d'onde comprise entre 350 et 650nm (le choix de la longueur

d'onde n'influence pas négativement les résultats tant qu'elle est choisie dans l'intervalle indiqué) [27]. Dans notre cas, une augmentation de la densité optique mesurée à 640 nm était observée au moment de la polymérisation (Figure 15) [13]. Le profil de la courbe obtenue est similaire à celui de la courbe décrite par De Cristofaro et *al.* pour un caillot de fibrine constitué *in vitro* par adjonction de thrombine [27].

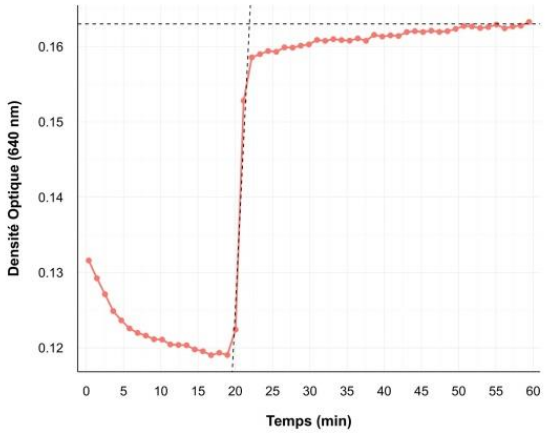

Figure 15 : Cinétique de polymérisation obtenue par suivi de la densité optique (DO) à 640nm [13] à une température de 37°C. Une brusque augmentation de la DO est observée au moment de la polymérisation. Le temps de polymérisation est défini comme le temps relevé à l'intersection de la tangente à la phase de croissance exponentielle avec l'asymptote (ici t=22min).

Il avait été relevé au cours de ces expérimentations qu'une proportion trop importante de $CaCl_2$ inhibait la polymérisation du gel (Figure 16) et affectait négativement sa vitesse de polymérisation. En effet, l'ajout de chlorure de calcium au lysat plaquettaire initie la polymérisation des fibres de fibrines dans le gel mais Yeromonahos et *al*. ont démontré que la concentration ionique était un facteur clé dans la formation du réseau, la taille des fibres et la structure de celles-ci [28]. Si elle dépasse 400 mOsm, les fibres adoptent une structure unique torsadée moins résistante que l'agencement en échelle normalement retrouvé [28].

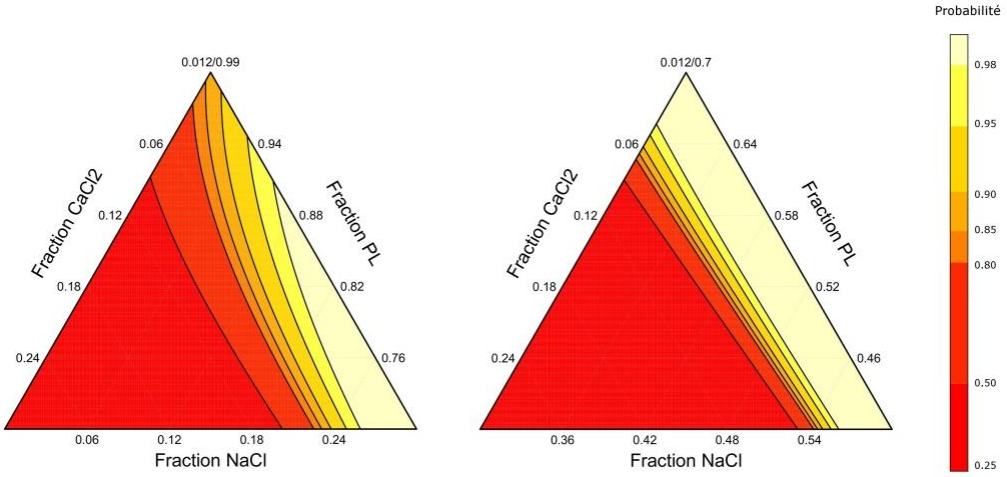

Figure 16 : Modélisation de la probabilité d'obtenir une polymérisation des hydrogels après une heure à 37°C en fonction des différentes proportions des constituants [13]. Les zones les plus rouges correspondent aux plus faibles probabilités.

Ainsi, des concentrations compatibles avec une polymérisation reproductible des hydrogels ont pu être définies. A l'issue des expérimentations – non détaillées dans cette thèse – menées sur les hydrogels (leur cinétique de polymérisation, leur utilisation comme matrice pour la prolifération, la migration et la différenciation de cellules stromales mésenchymateuses issues du tissu adipeux…), une formulation de gel en particulier a présenté les résultats les plus intéressants [13]. Cette formule, présentée dans le tableau 5, a été conservée puisqu'elle permet d'obtenir un gel qui offre des conditions propices à la survie, la multiplication et la migration des cellules testées. Cette composition a été utilisée pour la conception des hydrogels utilisés dans l'étude présentée ci-après.

Tableau 5 : Composition retenue pour la constitution des hydrogels à sécher dans le cadre de ce travail de thèse.

Constituants	% en volume	Mol/mL
Lysat plaquettaire	68,7%	
Solution de $CaCl_2$ à 10%	2,5%	$2{,}25.10^{-5}$
Solution de NaCl à 0,9%	28,6%	$4{,}40.10^{-3}$
Solution d'acide tranexamique à 10%	0,2%	$1{,}27.10^{-6}$

Le mélange des constituants est réalisé dans des récipients en verre capables de résister aux bains de trempage dans l'acétone. La polymérisation est effectuée à température ambiante.

Lors de la formation du gel, un réseau tridimensionnel similaire à ceux décrits dans la Première Partie du document est ainsi formé (Figure 17). Weigandt et *al*. puis Yeromonahos et *al*. ont évalué par technique SANS (« *Small-Angle Neutron Scattering* ») que le diamètre moyen des fibres de fibrine dans un caillot était approximativement de 120 nm [28,29]. Cette valeur varie avec la concentration en fibrinogène (le diamètre est plus faible si la concentration diminue) [28,29].

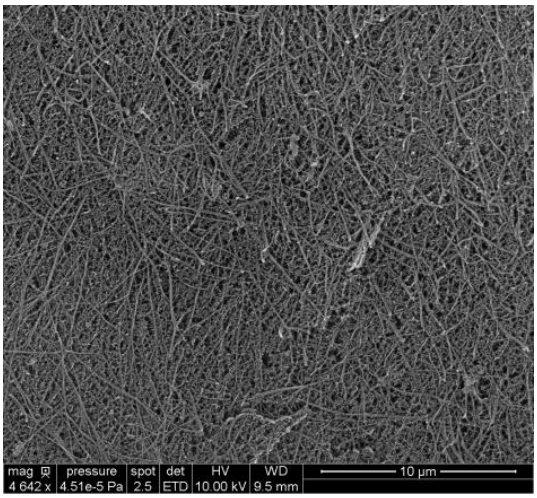

Figure 17 : Observation au Microscope Electronique à Balayage Environnemental (après congélation) du réseau de fibres de fibrine ayant polymérisé dans le gel.

2. Séchage des hydrogels au CO_2 supercritique

Le procédé de séchage d'hydrogels à l'aide d'un solvant porté à l'état supercritique a été décrit pour la première fois en 1932 et conduit à la formation de structures appelées aérogels [30]. La plupart des solvants organiques courants (acétone, méthanol, éthanol…) nécessitent des montées en température plus importantes pour dépasser leur point critique en comparaison

avec la température du point critique du dioxyde de carbone (235 °C pour l'acétone contre 31°C pour le CO_2). Cependant l'eau est très peu miscible dans le CO_2, qu'il soit à l'état liquide ou supercritique, et c'est la raison pour laquelle, le séchage direct de l'hydrogel dans une atmosphère de CO_2 à l'état supercritique ne peut pas être envisagée [31]. Il est donc nécessaire de rajouter une étape au cours de laquelle l'eau est substituée par un solvant miscible dans le CO_2. Les solvants utilisés pour réaliser cet échange sont l'acétone, le benzène, le butane, le dioxane, l'éthane, l'éthylacétoacétate ou encore l'éthanol sachant que les plus classiquement utilisés sont l'éthanol et l'acétone.

Ainsi, après avoir substitué l'eau contenue dans le réseau tridimentionnel de l'hydrogel par un solvant organique, ce dernier est à son tour substitué par le CO_2 à l'état liquide puis à l'état supercritique. Les différentes étapes du séchage sont représentées de manière simplifiées dans la figure 18.

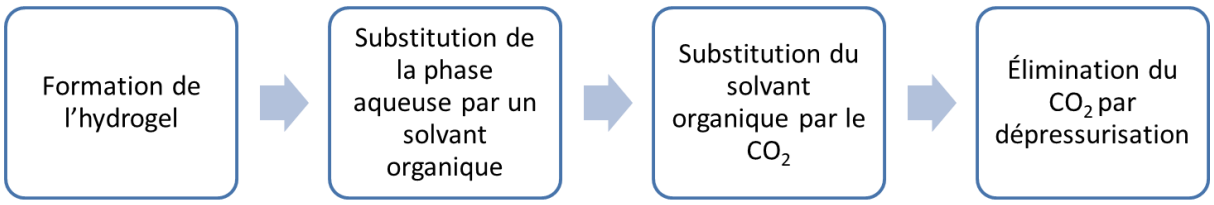

Figure 18 : Grandes étapes du procédé de séchage par CO_2 supercritique. L'étape de substitution de la phase aqueuse par un solvant organique est indispensable car cette phase n'est pas miscible dans le dioxyde de carbone.

Outre le temps de polymérisation du gel, quatre autres paramètres critiques ont été identifiés pour réussir la séquence de séchage :

- Le récipient utilisé pour effectuer le premier échange de solvant : eau/solvant organique ;
- Le nombre de rinçages effectués pour réaliser le second échange de solvant : solvant organique/CO_2 liquide ;

- Le temps passé en atmosphère supercritique (temps incubation) ;
- Le gradient de dépressurisation.

Ces différents points seront discutés par la suite.

a. Substitution de la phase aqueuse par un solvant

Note : une partie de ces travaux a été réalisée avec l'aide précieuse de M. Nicolas GANGNANT, stagiaire de Master 1 que nous avons co-encadré avec Mme. Sophie CAZALBOU entre avril et mai 2019.

Les gels de lysat plaquettaire sont constitués à plus de 95% de phase aqueuse (d'après les données détaillées plus loin dans la troisième partie) qui provient des différents éléments entrant dans sa constitution : le plasma sanguin et les solutions de NaCl, de $CaCl_2$ et d'acide tranexamique. La substitution de cette phase aqueuse par un solvant nécessite d'étudier plus précisément les phénomènes d'inter-diffusion qui se déroulent au sein du réseau fibreux. En effet la substitution de l'eau par le solvant organique nécessite d'une part la diffusion vers l'extérieur du matériau de la phase aqueuse accompagnée par la pénétration simultanée du solvant organique à l'intérieur du réseau poreux du matériau.

Cette cinétique (résumée dans la figure 19) dépend des concentrations en solvants organiques dans le bain de trempage et dans le réseau de fibres :

- Au début du trempage, le solvant est pur dans le bain de trempage. L'eau présente dans le gel est quant à elle un soluté : le solvant vient la diluer au cœur du matériau.

- Ensuite, le bain de trempage, n'est plus constitué de solvant pur mais d'un mélange eau/acétone très concentré en solvant. L'intérieur du réseau de fibres contient lui un milieu aqueux peu concentré en solvant. La concentration en solvant étant différente de part et d'autres du réseau (qui prend fonction de membrane perméable), l'eau est attirée vers le compartiment le plus concentré, c'est-à-dire en direction du bain de trempage, hors du matériau. A volume constant, l'acétone prend sa place dans le réseau.

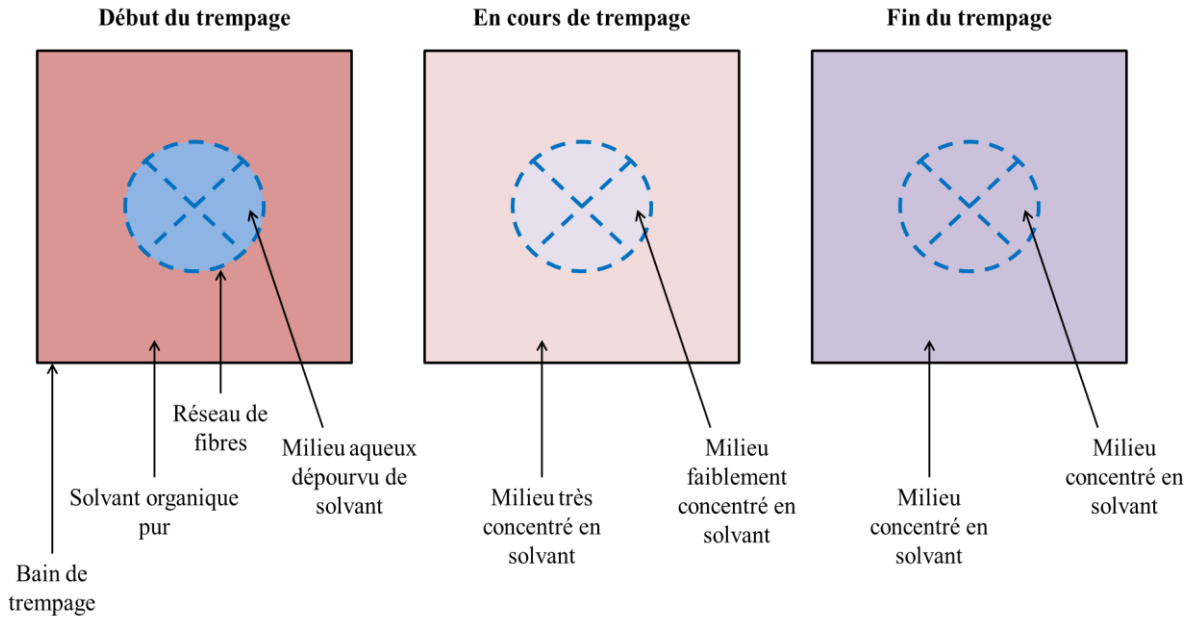

Figure 19 : Représentation schématique de la cinétique de la pénétration du solvant organique dans le réseau fibreux.

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser l'acétone et l'éthanol pour substituer la phase aqueuse contenue dans les hydrogels. Il s'agit des deux solvants organiques miscibles dans le CO_2 les plus utilisés. Nous comparons ici les propriétés de diffusion de ces deux solvants pour choisir le solvant le plus approprié pour développer le protocole de séchage final.

La vitesse à laquelle se produit la diffusion du solvant dans le matériau est liée à la concentration en solvant et au flux molaire, elle est régie par la loi de Fick [32] :

$$F = -D_{ab} \times S \times \frac{dC}{dX}$$

Où :

- F est le flux de substance, soit la vitesse de diffusion, (en mol/s)
- D_{ab} est le coefficient de diffusion de a dans b (ici de l'eau (a) dans le solvant (b)) (en cm^2/s)*
- S est la section de passage entre les deux solutions (en cm^2)
- $\frac{dC}{dX}$ est le gradient de concentration (en mol/cm^2).

* D est calculé à partir de la formule de Wilke et Chang [33] :

$$D_{ab} = 7{,}4.10^{-8} \times \frac{T}{\mu_b} \times \frac{\sqrt{M_b}}{{V_a}^{0,6}}$$

Où :

- T est la température en °C
- μ_b est la viscosité du solvant (en centipoise)
- V_a est le volume molaire du soluté à sa température d'ébullition (en cm^3/mol)
- M_b est la masse molaire du solvant (en g/mol).

Les coefficients de diffusion $D_{eau\text{-}acétone}$ et $D_{eau\text{-}éthanol}$ sont respectivement de $4{,}56.10^{-5}$ cm^2/s et de $1{,}24.10^{-5}$ cm^2/s [32]. Il est ainsi attendu que l'acétone permettra d'obtenir un échange eau/solvant organique plus rapide que celui obtenu avec l'éthanol.

Pour vérifier expérimentalement cette hypothèse, nous avons appliqué un modèle théorique basé sur l'évolution d'un front de concentration entre les deux substances. La finalité attendue est une uniformisation des concentrations dans tout le milieu. 1mL de gel est placé dans un

récipient cylindrique en verre de 7 mm de diamètre. Les récipients sont ensuite placés dans 250 mL de solvant (acétone ou éthanol). Des photos ont été prises à différents temps (t=0, 1h, 10h, 15h, 24h, 48h, 72h) pour évaluer numériquement à l'aide du logiciel Image J (Wayne Rasband, NIH, Etats-Unis) la distance de pénétration des solvants. Celle-ci était observée par un changement de couleur progressif du gel qui devient blanc au cours du temps, d'autant que la diffusion ne se fait que dans une seule direction puisque seule la face supérieure du gel est laissée libre et au contact du solvant. Les autres surfaces sont accolées à la paroi du récipient en verre (Figures 20 et 21). Une substitution complète de la phase aqueuse est considérée comme acquise à partir du moment où l'intégralité du gel est blanc.

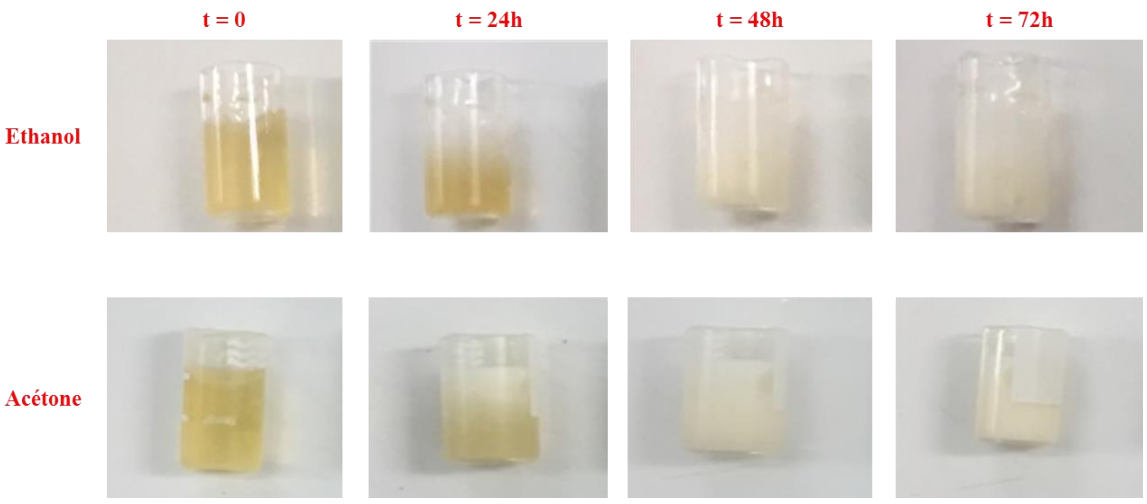

Figure 20 : Evolution de la diffusion de solvant (éthanol vs. acétone) dans les gels de lysat plaquettaire. L'eau contenue dans le gel est substituée par le solvant ce qui a pour effet de blanchir le gel.

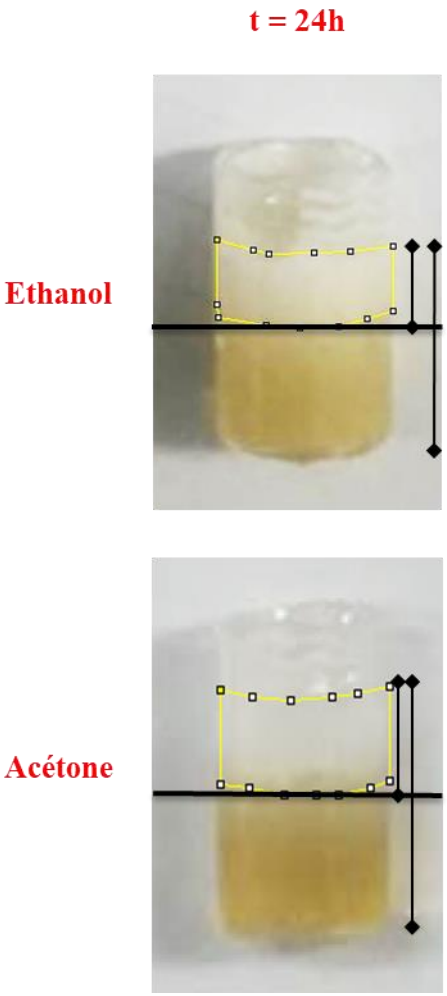

Figure 21 : Détermination du front de diffusion à l'aide du logiciel image J.

La diffusion de l'acétone dans les gels est, comme attendu, plus rapide que celle obtenue avec l'éthanol (Figure 22). En effet, 48h suffisent pour que l'acétone diffuse totalement et de façon reproductible dans le gel alors qu'il faut compter près de 72h pour l'éthanol.

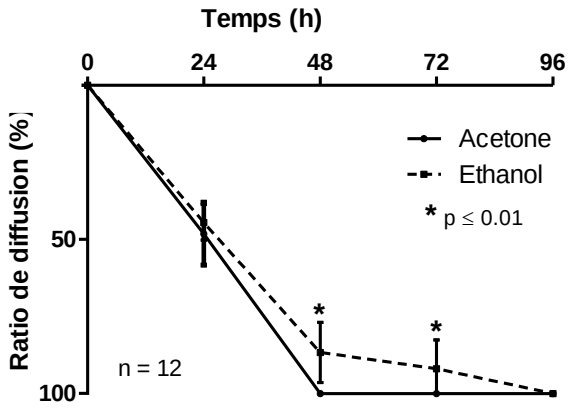

Figure 22 : Graphe représentant le ratio de diffusion des solvants acétone vs. éthanol par rapport au volume total des gels de lysat plaquettaire (n=12). Un astérisque (*) indique une p-value inférieure ou égale à 0,01.

L'acétone est ainsi retenu comme solvant pour la suite du protocole de séchage.

Une fois la formation du gel achevée, un temps de trempage minimal de 48h dans des bains de solvant est nécessaire avant de passer à la suite des étapes. 250 mL de solution d'acétone sont utilisés pour le trempage de 10 mL de gels afin que le solvant soit largement en excès et qu'un état d'équilibre 50%/50% entre l'eau et l'acétone ne puisse pas être atteint. Un changement de bain ou un renouvellement de l'acétone dans le bain après 24h de trempage permet en outre de maintenir une concentration du bain de trempage élevée en acétone et de s'affranchir ainsi des problèmes liés à la dilution du bain par l'eau libérée par l'hydrogel.

L'étape de substitution eau-acétone est conditionnée par la vitesse de percolation du solvant organique à l'intérieur du réseau fibreux du matériau et par conséquent par les phénomènes de diffusion. La porosité du matériau et les solvants qui constituent le système restant inchangés, cette étape de substitution est donc conditionnée par la surface du matériau mise à disposition du solvant organique. Afin de ne pas endommager la structure fibreuse de l'hydrogel au cours de sa manipulation, le récipient en verre contenant l'hydrogel est transféré directement dans le

bain d'acétone. Seule la face supérieure du cylindre gélifié est ainsi en contact avec la solution organique engendrant une progression lente de ce dernier de haut en bas dans le gel. Afin de finaliser la pénétration de la nouvelle solution de substitution à l'intérieur du réseau fibreux, l'organogel obtenu est extrait du récipient en verre pour être transféré dans un support métallique grillagé (en acier inoxydable) qui est à son tour plongé dans un nouveau bain de rinçage. De nouveaux phénomènes de diffusion, cette fois-ci multidirectionnels s'engagent sur la totalité de la surface externe du gel.

En conclusion, une première phase de trempage en acétone d'au moins 24h se réalise dans le récipient en verre, puis le gel partiellement imbibé d'acétone est transféré dans un récipient métallique grillagé qui permet d'achever plus rapidement la substitution eau-acétone sans risquer de fragiliser la structure du gel. Ces temps de trempage ont été calculés sur des gels de 1 mL constitués dans des récipients en verre de diamètre 0,7 cm. Comme la loi de Fick développée plus tôt le précisait, la diffusion est directement proportionnelle à la surface d'échange entre les milieux. Des échantillons de volumes deux fois supérieurs doivent être réalisés dans des récipients de diamètre deux fois supérieur et ainsi de suite. Cela a été confirmé expérimentalement avec des gels de 4 mL constitués dans des récipients de 2,8 cm de diamètre.

b. Substitution du solvant par le CO_2 liquide

Avant de procéder au séchage des gels en CO_2 à l'état supercritique, il convient de réaliser une dernière étape de lavage qui consiste à substituer le solvant organique contenu dans le réseau poreux du gel par du CO_2 liquide. Ainsi les hydrogels sont sortis des bains d'acétone et

placés avec leurs contenants métalliques dans l'enceinte du sécheur dont la température a préalablement été réglée sur 5 °C. Du CO_2 liquide est alors introduit dans la chambre jusqu'à ce que la pression atteigne 35 bar (correspondant au remplissage de la moitié du réacteur) (Figure 23).

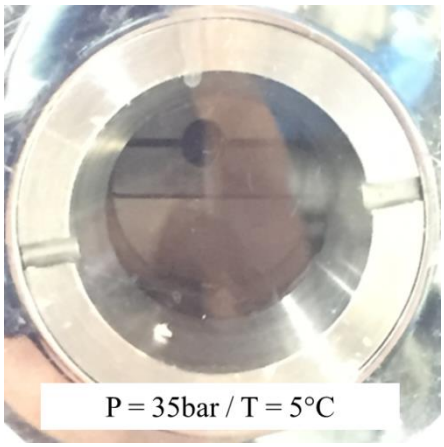

Figure 23 : Photographie de la chambre du sécheur dont la partie inférieure est occupée de CO_2 liquide et la partie supérieure par du CO_2 gazeux.

Deux phénomènes concomitants se produisent alors : la diffusion de l'acétone hors du matériau et la pénétration du CO_2 liquide à l'intérieur celui-ci. Il convient alors de remplacer le CO_2 dilué par l'acétone de l'aérogel par du CO_2 liquide pur de manière à s'éloigner de l'état d'équilibre et favoriser les échanges acétone-CO_2 liquide. Le renouvellement du CO_2 liquide dilué peut s'effectuer de deux manières :

- Soit de façon à ce que du CO_2 entre dans l'enceinte en permanence en même temps qu'un flux équivalent en est évacué ;
- Soit selon une alternance de périodes de vidange, de remplissage et d'incubation.

Nous avons choisi la seconde méthode, moins consommatrice en dioxyde de carbone et moins agressive pour le réseau de fibres qui n'est ainsi pas soumis à un flux vertical continu de CO_2 qui circulerait depuis la vanne d'entrée supérieure jusqu'à la vanne de sortie en bas de l'appareil.

Les travaux de Wawrzyniak et *al.* et de Andersson et *al.* repris par Yasmine Masmoudi dans le cadre d'une étude sur le séchage de gels de silice mettent en évidence que la phase de lavage au CO_2 supercritique sur des structures poreuses qui présentent des pores de taille nanométrique peut prendre plusieurs heures [34]. La diffusion du solvant au travers des pores est en effet ralentie s'il s'agit de pores de petite taille.

Rogacki et *al.* en 1995, toujours sur des gels de silice, ont évalué qu'il fallait entre 60 et 75 minutes d'incubation à 20 °C dans du CO_2 liquide pour que celui-ci ait correctement diffusé dans la structure [35].

En l'absence de données dans la littérature sur le lavage de gels de lysat plaquettaire, nous nous sommes appuyés sur les données précédentes afin d'anticiper des temps d'incubation de 60 minutes pour nos gels de LP qui présentent, comme cela sera détaillé dans la Troisième partie, des pores dont les diamètres sont compris entre 7 nm et 100 µm. Après 1 heure d'incubation, nous avons réalisé une vidange de la chambre de l'appareil puis nous avons ajouté de nouveau du CO_2 liquide. Cette séquence de « lavage » a été effectuée de 1 à 5 fois pour évaluer le nombre de lavage minimal à réaliser pour substituer la totalité de l'acétone. La répétition de trois rinçages au minimum avec intervalle de 1 heure entre chacun s'est avérée être la solution de choix.

c. Séchage en atmosphère supercritique

Suite à la vidange du troisième rinçage en CO_2 liquide, un quatrième remplissage est effectué. Le thermostat est alors réglé de façon à modifier les conditions d'incubation et à permettre le passage du dioxyde de carbone vers son état supercritique. La température est ainsi augmentée à 43 °C et la pression à 90 bar (Figure 24).

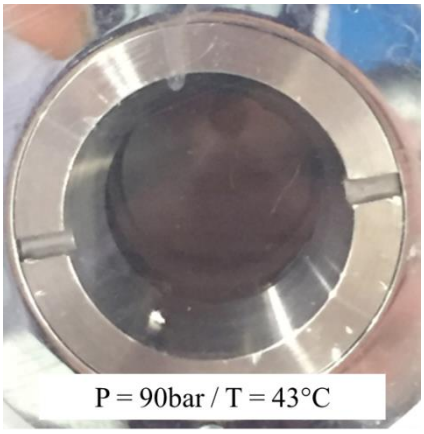

Figure 24 : Photographie de la chambre du sécheur une fois l'état supercritique atteint. L'interface liquide/gaz du CO_2 n'est plus visible.

Au-delà du point critique, le CO_2 présente un coefficient de pénétration très élevé dans les réseaux de polymères comme le nôtre [36]. Le séchage est qualifié de monophasique [37,38] car le CO_2 est maintenu à l'état supercritique tout au long du temps de traitement. S'il retrouve une forme différente liquide et/ou gazeuse à cause d'une baisse de température ou d'une chute de la pression, une interface liquide/vapeur réapparaît dans l'appareil et conduit à une condensation au contact des fibres et donc à un échec du séchage [39].

Ces conditions sont maintenues 1, 2, 3, 4 ou 5 heures (selon les essais réalisés dans le cadre de l'optimisation du procédé) puis une dépressurisation est effectuée. L'objectif est de conserver la structure séchée du réseau tridimensionnel du gel fibreux au cours du séchage sans réduire sa porosité ou créer un effondrement de la structure lié à une dilatation excessive et rapide du réseau poreux avec déstructuration des parois des parois du réseau.

Contrairement à la vitesse de dépressurisation, le temps passé en atmosphère supercritique ne semble pas influencer l'état final du matériau.

En effet, la vitesse de dépressurisation influence définitivement le volume, la structure et la porosité du matériau obtenu. Lors de la phase de dépressurisation, le CO_2 à l'état supercritique repasse à l'état gazeux entrainant une augmentation de son propre volume. Si la dépressurisation est trop rapide, le dioxyde de carbone qui avait pénétré au cœur du réseau de fibres reste piégé dans le matériau sans avoir le temps de s'en extraire *via* le réseau poreux. Les contraintes mécaniques induites par le changement d'état sont alors très importantes [40] et entraînent la dislocation de la structure non élastique. Scherer et *al.* ont établi les équations permettant de prédire les contraintes appliquées sur un gel sec de silice lors de la dépressurisation [41]. Théoriquement, ces contraintes doivent rester inférieures aux contraintes maximales que le matériau peut subir avant de se rompre même si en pratique il est compliqué de les mesurer. Les contraintes subies durant la dépressurisation (σ_{co} exprimé en Pa) sont ainsi exprimées de la sorte :

$$\sigma_{co} = C_{\upsilon} \times ([P_F] - P_A)$$

Où :

- $[P_F]$ est la pression moyenne du fluide dans le matériau (exprimée en Pa). Son calcul sera détaillé ci-après ;
- P_A est la pression dans l'appareil de séchage (en Pa) ;
- C_{υ} est calculé grâce à la formule suivante (avec υ le coefficient de Poisson dont la valeur est estimée approximativement à 0,4 (elle est de 0,25 pour des matrices gélifiées de fibrine [42] mais bien de 0,4 en moyenne pour les polymères secs [43]) :

  $$C_{\upsilon} = \frac{(1-2\upsilon)}{(1-\upsilon)}$$

Le calcul de $[P_F]$ suit la formule suivante :

$$[P_F] = \frac{\frac{\alpha}{\sqrt{\pi}}}{e^{(\frac{P_A}{\alpha})^2} \times \mathrm{erfc}(\frac{P_A}{\alpha})}$$

Où :

- e est la fonction exponentielle ;
- erfc est la fonction d'erreur ;
- P_A est ici encore la pression dans l'appareil de séchage (en Pa) ;
- la constante α (exprimée en Pa) est calculée selon l'équation :

$$\alpha = \sqrt{(\frac{2}{k}) \times (\frac{P_0}{\tau_D}) \times (\frac{(1-\rho)\,\eta_F L^2}{D_F})} = \sqrt{(\frac{2}{k}) \times (\frac{P_0}{\tau_D}) \times (\frac{\varepsilon \eta_F L^2}{D_F})}$$

Où :

- k est une constante dont la valeur est égale à 3 si le matériau est plat, 8 s'il est cylindrique et 15 s'il est sphérique [41] ;
- P_0 est la pression initiale dans l'appareil (similaire à P_A) (en Pa) ;
- τ_D est le temps de dépressurisation (en secondes) ;
- ρ est la proportion de solide dans le matériau, donc 1-ρ la proportion de vide (ou taux de porosité ou ε) (en %),
- η_F est la viscosité du fluide donc du CO_2 (égale à 70. µPa.s) ;
- D_F est la perméabilité du matériau au fluide (approchée à $5{,}033.10^{-12}$ m² [44]) ;
- L est la dimension caractéristique du matériau (en m) telle qu'elle a déjà été définie précédemment.

La formule de σ_{co} désormais développée :

$$\sigma_{co} = C_\upsilon \times ([P_F] - P_A) = C_\upsilon \times \left((\frac{\frac{\alpha}{\sqrt{\pi}}}{e^{\left(\frac{P_A}{\alpha}\right)^2} \times \mathrm{erfc}\left(\frac{P_A}{\alpha}\right)}) - P_A \right)$$

peut, selon Woignier et *al.*, être simplifiée de la sorte [40] :

$$\sigma_{co} \approx \frac{C_\upsilon \times \sqrt{\pi} \times \alpha^2}{\pi \times \alpha + 2{,}5 \times P_A}$$

Afin de déterminer le gradient de pression optimal qui permet de maintenir la structure du gel intacte, différents gradients de dépressurisation calculés par l'intermédiaire du temps nécessaire pour diminuer la pression de l'enceinte de 90 bar à la pression atmosphérique, ont été testés : 30 secondes (ΔP=3 bar.s^{-1}), 1 minute (ΔP=1,5 bar.s^{-1}), 2 minutes (ΔP=0,75 bar.s^{-1}), 4 minutes (ΔP=0,375 bar.s^{-1}), 5 minutes (ΔP=0,3 bar.s^{-1}), 8 minutes (ΔP=0,19 bar.s^{-1}) et 10 minutes (ΔP=0,15 bar.s^{-1}).

Il apparaît que l'échantillon subit davantage de contraintes si la dépressurisation est rapide (Tableau 6). A l'issue des différents séchages, une dépressurisation de 30 secondes conduit à une perte considérable du volume de la mousse qui a partiellement éclaté.

Tableau 6 : Contraintes appliquées sur les matrices cylindriques de fibrine de différents volumes à la fin du procédé de séchage au CO_2 supercritique. La pression initiale dans l'appareil est de 90 bars soit 9.10^6 Pa. La porosité des matrices est présentée dans la troisième partie de ce travail et est considérée de 83,42% dans les calculs.

Volume du matériau et grandeur caractéristique	Temps de dépressurisation (vitesse de dépressurisation)	Valeur de α	Contrainte maximale que subit le matériau : σ_{co}
1 mL / 7mm	30 s (ΔP=3.10^5 Pa.s^{-1})	20,65 Pa	1,01.10^{-3} Pa
1 mL / 7mm	60s (ΔP=1,5.10^5 Pa.s^{-1})	14,6 Pa	5,04.10^{-4} Pa
1 mL / 7mm	120s (ΔP=7,5.10^4 Pa.s^{-1})	10,32 Pa	2,52.10^{-4} Pa
1 mL / 7mm	240s (ΔP=3,75.10^4 Pa.s^{-1})	7,3 Pa	1,26.10^{-4} Pa
1 mL / 7mm	300s (ΔP=3.10^4 Pa.s^{-1})	6,53 Pa	1,01.10^{-4} Pa
1 mL / 7mm	480s (ΔP=1,9.10^4 Pa.s^{-1})	5,16 Pa	6,3.10^{-5} Pa
1 mL / 7mm	600s (ΔP=1,5.10^4 Pa.s^{-1})	4,62 Pa	5,04.10^{-5} Pa

Nous en déduisons qu'une fibre dans le matériau ne peut pas subir de contraintes en dépressurisation de plus de 5,04.10^{-4}Pa (valeur obtenue pour un dégazage de 60 secondes qui a conduit à la réussite du procédé de séchage).

Il existe un autre phénomène qui peut être observé au cours de la dépressurisation : la condensation capillaire. Il s'agit du remplissage de la structure poreuse par un fluide à l'état

liquide. Les conditions de pression sont inférieures à l'équilibre liquide/gaz de ce fluide donc il reste à l'état liquide et conduit à un échec du séchage. [45,46]. La condensation capillaire survient dans deux situations :

- si la dépressurisation se fait trop lentement et que le CO_2 retrouve une forme liquide avant la fin de la séquence de séchage ;
- ou si la substitution de l'acétone par le CO_2 liquide s'est avérée incomplète car le solvant organique reste liquide même lors de la montée en température et en pression (qui n'est destinée qu'à atteindre le point critique du dioxyde de carbone).

La première situation peut difficilement survenir dans les conditions de températures utilisées dans notre protocole. La seconde situation est en revanche possible.

L'étude de l'influence des paramètres du procédé sur l'état du gel sec a donc été réalisée. Un séchage était considéré comme réussi si le biomatériau obtenu réunissait les trois conditions suivantes (Figure 25) :

1. Pas de perte de volume
2. Conservation de la couleur blanche
3. Consistance de mousse sèche

La perte de volume signifie un effondrement de la structure fibreuse alors que la persistance d'une coloration jaune sur le matériau et/ou la présence d'une humidité résiduelle indiquaient une substitution incomplète de la phase aqueuse ou du solvant lors du procédé de séchage.

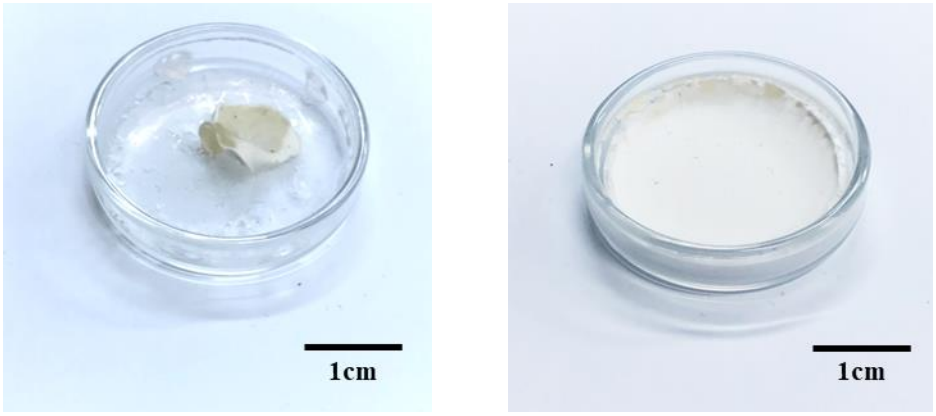

Figure 25 : Exemples de résultats obtenus à l'issue du processus de séchage. La photographie de gauche présente une mousse ayant perdu de son volume à cause d'une substitution insuffisante de la phase aqueuse par les solvants au préalable du passage en atmosphère dioxyde de carbone. La photographie de droite représente un cas de succès.

L'ensemble des paramètres évalués a permis de définir les conditions de séchage optimales (Figure 26). Nous retiendrons pour la suite des expérimentations le protocole reproductible suivant (résumé sur la Figure 27) appliqué à des gels de 1mL de volume :

- Trempage pendant 48 h en bains d'acétone ;
- Répétition de 3 rinçages en CO_2 liquide (5 °C, 35 bar) d'une durée d'1 heure chacun ;
- Incubation en atmosphère supercritique (43 °C, 90 bar) pendant 4 heures ;
- Dépressurisation à la vitesse de 1,5 bar/s.

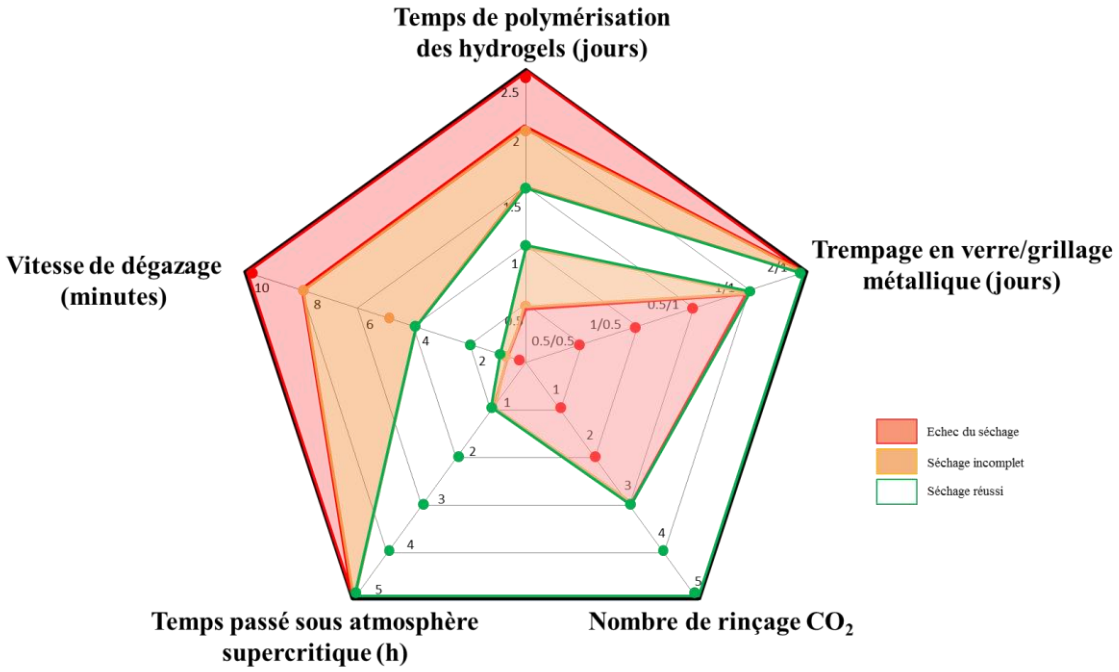

Figure 26 : Diagramme présentant l'influence des cinq paramètres majeurs sur la qualité du séchage des hydrogels de lysats plaquettaires par l'utilisation de CO_2 supercritique. La zone délimitée par le cadre vert représente les conditions dans lesquelles le séchage s'effectue de manière optimale, sans perte de volume ni résidu d'humidité. Les conditions retrouvées dans la zone orange conduisent à un séchage de qualité inconstante. Les conditions en rouge mènent à un échec.

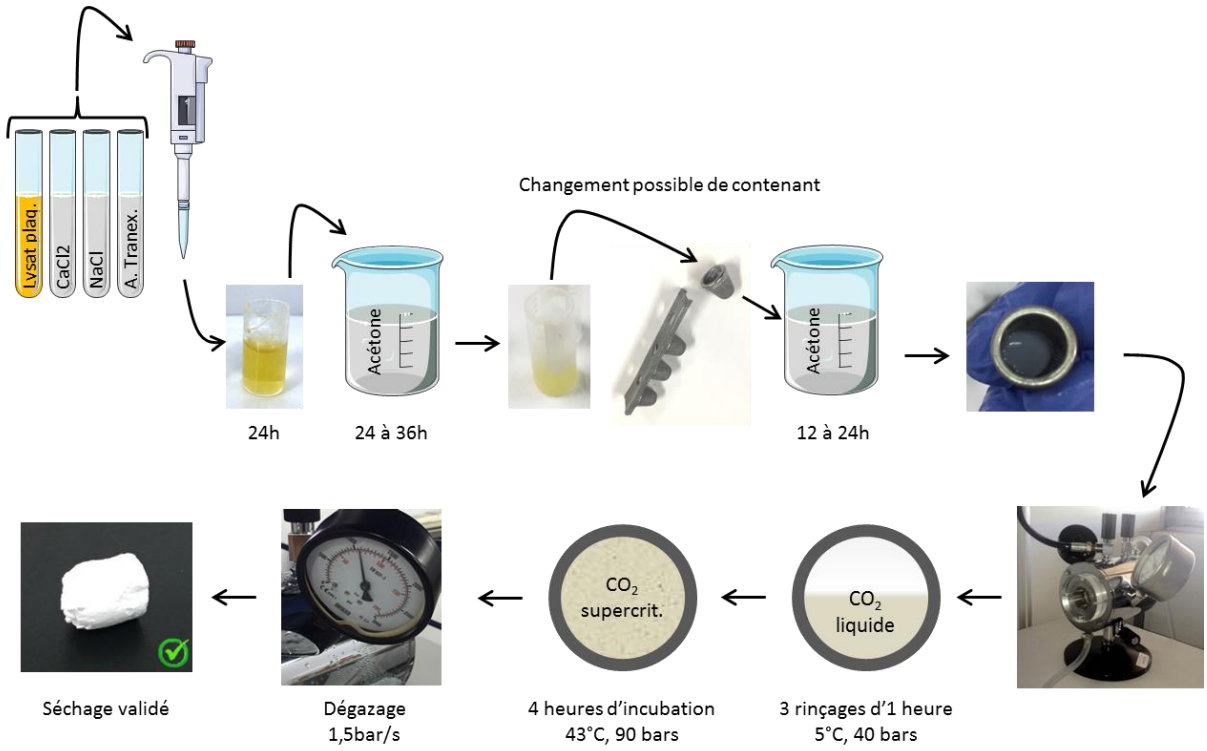

Figure 27 : Protocole complet de la conception des mousses sèches de lysat plaquettaire depuis la constitution des hydrogels jusqu'à l'obtention du biomatériau sec.

L'enchainement des étapes du processus ne diffère pas sur des hydrogels de plus grands volumes si un rapport de proportionnalité a été respecté entre l'augmentation de volume et le changement de diamètre du récipient en verre.

De façon plus précise, les dimensions de l'échantillon sont prises en compte dans un modèle mathématique de diffusion basé sur l'extrapolation non thermique de l'équation de Fourier [34,47]. Cette équation découle en effet de la théorie de la pénétration et permet de déterminer le temps d'incubation nécessaire lors de notre protocole :

$$F = \frac{D_{eff} \times t}{L^2}$$

Où :

- F est le nombre de Fourier (calculé à 195 avec les gels réalisés en récipients de 0,7 cm de diamètre). Si F est grand, cela signifie que la diffusion a lieu profondément dans la structure ;
- D_{eff} est le coefficient de diffusion effectif à travers les gels ($m^2.s^{-1}$) c'est-à-dire le coefficient de diffusion du liquide étudié dans le CO_2 [48]. D'après l'équation de Wilke et Chang présentée plus haut, ce coefficient pour la diffusion de l'acétone dans le dioxyde de carbone est calculé à $2{,}65.10^{-6}$ $m^2.s^{-1}$;
- t est la durée du lavage (s) ;
- L est la dimension de l'hydrogel (il s'agit du rapport entre son volume (en m^3) et la surface d'échange (en m^2) mais de façon simple si c'est un parallélépipède, L est son épaisseur ; si c'est un cylindre ou une sphère, L est son diamètre) (m).

La réalisation d'échantillons plus volumineux de diamètre 1,8 cm (volume 10mL) mène à un calcul du temps de trempage à 6 heures et 40 minutes.

L'incubation en atmosphère supercritique ne sera en revanche pas modifiée car la transition de phase du CO_2 est uniquement sous la dépendance des conditions de pression et de température [49] et n'est pas influencée par la forme ou la taille du biomatériau.

Pour conclure le protocole de séchage des hydrogels de lysat plaquettaire par CO_2 supercritique a été mis au point et validé. Les étapes suivantes permettent l'obtention d'une mousse sèche de lysat plaquettaire :

- **Constitution d'hydrogels de lysat plaquettaire ;**
- **Trempage pendant 48h en bains d'acétone ;**
- **Répétition de 3 rinçages en CO_2 liquide (5°C, 35bars) d'une durée d'1h chacun ;**
- **Incubation en atmosphère supercritique (43°C, 90bars) pendant 4 heures ;**
- **Dépressurisation à la vitesse minimale de 1,5bar/s.**

La caractérisation complète de ces mousses pour définir leurs propriétés, leurs indications et les modifications éventuelles à leur apporter sera développée dans la Troisième Partie de ce travail.

III. Références de la deuxième partie

[1] Duarte ARC, Santo VE, Alves A, Silva SS, Moreira-Silva J, Silva TH, et al. Unleashing the potential of supercritical fluids for polymer processing in tissue engineering and regenerative medicine. J Supercrit Fluids 2013;79:177–85. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.004.

[2] Peach J, Eastoe J. Supercritical carbon dioxide: a solvent like no other. Beilstein J Org Chem 2014;10:1878–95. https://doi.org/10.3762/bjoc.10.196.

[3] Nejad-Sadeghi M, Taji S, Goodarznia I. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from Dracocephalum kotschyi Boiss: An endangered medicinal plant in Iran. J Chromatogr A 2015;1422:73–81. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.040.

[4] Autefage H, Briand-Mésange F, Cazalbou S, Drouet C, Fourmy D, Gonçalvès S, et al. Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate porous ceramics. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009;91:706–15. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31447.

[5] Goel SK, Beckman EJ. Generation of microcellular polymeric foams using supercritical carbon dioxide. I: Effect of pressure and temperature on nucleation. Polym Eng Sci 1994;34:1137–47. https://doi.org/10.1002/pen.760341407.

[6] Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. Biomaterials 1996;17:1417–22.

[7] Tsioptsias C, Paraskevopoulos MK, Christofilos D, Andrieux P, Panayiotou C. Polymeric hydrogels and supercritical fluids: The mechanism of hydrogel foaming. Polymer 2011;52:2819–26. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.04.043.

[8] Vintiloiu A, Leroux J-C. Organogels and their use in drug delivery--a review. J Control Release Off J Control Release Soc 2008;125:179–92. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.09.014.

[9] Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. J R Soc Interface 2007;4:999–1030. https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0220.

[10] Hile DD, Amirpour ML, Akgerman A, Pishko MV. Active growth factor delivery from poly(D,L-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO(2). J Control Release Off J Control Release Soc 2000;66:177–85.

[11] Hile DD, Pishko MV. Solvent-free protein encapsulation within biodegradable polymer foams. Drug Deliv 2004;11:287–93. https://doi.org/10.1080/10717540490493961.

[12] Santo VE, Duarte ARC, Popa EG, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming. J Control Release Off J Control Release Soc 2012;162:19–27. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.001.

[13] Canceill T, Kemoun P, Joniot S, Casteilla L, Planat-Benard V, Monsarrat P. A fibrin-based hydrogel for adipose mesenchymal stem cells graft: a suitable biomaterial for periodontal tissue engineering? Poster 2, Paris, France: 2017.

[14] O'Leary R, Wood EJ. A novel in vitro dermal wound-healing model incorporating a response to mechanical wounding and repopulation of a fibrin provisional matrix. Vitro Cell Dev Biol - Anim 2003;39:204–7. https://doi.org/10.1290/1543-706X(2003)039<0204:ANIVDW>2.0.CO;2.

[15] Rouillard AD, Holmes JW. Mechanical boundary conditions bias fibroblast invasion in a collagen-fibrin wound model. Biophys J 2014;106:932–43. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.002.

[16] Brown LF, Lanir N, McDonagh J, Tognazzi K, Dvorak AM, Dvorak HF. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. Am J Pathol 1993;142:273–83.

[17] Fortunato TM, Beltrami C, Emanueli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. Sci Rep 2016;6:25326. https://doi.org/10.1038/srep25326.

[18] Alavi A, Stupack DG. Cell Survival in a Three-Dimensional Matrix. Methods Enzymol., vol. 426, Academic Press; 2007, p. 85–101. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)26005-7.

[19] Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. Cell 1998;95:365–77.

[20] Moreno-Arotzena O, Meier J, del Amo C, García-Aznar J. Characterization of Fibrin and Collagen Gels for Engineering Wound Healing Models. Materials 2015;8:1636–51. https://doi.org/10.3390/ma8041636.

[21] Şeker Ş, Elçin AE, Elçin YM. Autologous protein-based scaffold composed of platelet lysate and aminated hyaluronic acid. J Mater Sci Mater Med 2019;30:127. https://doi.org/10.1007/s10856-019-6334-7.

[22] Jennifer Shepherd, Daniel Bax, Serena Best, Ruth Cameron. Collagen-Fibrinogen Lyophilised Scaffolds for Soft Tissue Regeneration. Materials 2017;10:568. https://doi.org/10.3390/ma10060568.

[23] Michallet M, Pitard A. Transfusion de plaquettes : produits, indications. Haute Autorité de Santé; 2015.

[24] Godier A, Roberts I, Hunt BJ. Tranexamic acid: less bleeding and less thrombosis? Crit Care Lond Engl 2012;16:135. https://doi.org/10.1186/cc11374.

[25] Piepel GF, Cornell JA. Mixture experiment approaches: examples, discussion, and recommendations. J Qual Technol 1994;26:177–96.

[26] Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. Blood 2013;121:1712–9. https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-306639.

[27] De Cristofaro R, Di Cera E. Phenomenological analysis of the clotting curve. J Protein Chem 1991;10:455–68. https://doi.org/10.1007/BF01025473.

[28] Yeromonahos C, Polack B, Caton F. Nanostructure of the fibrin clot. Biophys J 2010;99:2018–27. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.059.

[29] Weigandt KM, Pozzo DC, Porcar L. Structure of high density fibrin networks probed with neutron scattering and rheology. Soft Matter 2009;5:4321–30. https://doi.org/10.1039/B906256D.

[30] Kistler SS. Coherent Expanded-Aerogels. J Phys Chem 1932;36:52–64. https://doi.org/10.1021/j150331a003.

[31] Brinker CJ, Scherer GW. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. Boston: Academic Press; 1990.

[32] Cussler EL. Diffusion: mass transfer in fluid systems. 3rd ed. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2009.

[33] Wilke CR, Chang P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. AIChE J 1955;1:264–70. https://doi.org/10.1002/aic.690010222.

[34] Masmoudi Y. Etude du séchage au CO2 supercritique pour l'élaboration de matériaux nanostructurés : application aux aérogels de silice monolithiques. Thèse pour le grade de Docteur de l'Ecole des Mines de Paris. Mines Paris - Collège Doctoral, 2006.

[35] Rogacki G, Wawrzyniak P. Diffusion of ethanol-liquid CO2 in silica aerogel. J Non-Cryst Solids 1995;186:73–7. https://doi.org/10.1016/0022-3093(95)00073-9.

[36] Lin S, Yang J, Yan J, Zhao Y, Yang B. Sorption and Diffusion of Supercritical Carbon Dioxide in a Biodegradable Polymer. J Macromol Sci Part B 2010;49:286–300. https://doi.org/10.1080/01495930903352308.

[37] Lichtenthaler RN. Gerd Brunner: Gas Extraction - An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Topics in Physical Chemistry, Vol. 4, eds. H. Baumgärtel, E. U. Franck, W. Grünbein. Steinkopff, Darmstadt/Springer, New York, 1994, 387 S., DM 64,—. Berichte Bunsenges Für Phys Chem 1996;100:1090–1. https://doi.org/10.1002/bbpc.19961000668.

[38] Stephan K, Lucas K. Viscosity of dense fluids. New York: Plenum Press; 1979.

[39] Woignier T. Aérogels - Aspects fondamentaux. Tech Ing 2017:34.

[40] Woignier T, Scherer GW, Alaoui A. Stress in aerogel during depressurization of autoclave: II. Silica gels. J Sol-Gel Sci Technol 1994;3:141–50. https://doi.org/10.1007/BF00486720.

[41] Scherer GW. Stress in aerogel during depressurization of autoclave: I. theory. J Sol-Gel Sci Technol 1994;3:127–39. https://doi.org/10.1007/BF00486719.

[42] Duong H, Wu B, Tawil B. Modulation of 3D Fibrin Matrix Stiffness by Intrinsic Fibrinogen–Thrombin Compositions and by Extrinsic Cellular Activity. Tissue Eng Part A 2009;15:1865. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0319.

[43] Le Neindre B. Constantes mécaniques Coefficients d'élasticité. Tech Ing Introd Aux Constantes Phys-Chim 1991;base documentaire : TIB342DUO.

[44] Chiu CL, Hecht V, Duong H, Wu B, Tawil B. Permeability of Three-Dimensional Fibrin Constructs Corresponds to Fibrinogen and Thrombin Concentrations. BioResearch Open Access 2012;1:34. https://doi.org/10.1089/biores.2012.0211.

[45] Reedijk J. Comprehensive inorganic chemistry II. vol. 5. Amsterdam: Elsevier; 2013.

[46] Chang Q. Surface of Solids. Colloid Interface Chem. Water Qual. Control, Elsevier; 2016, p. 175–225. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809315-3.00010-4.

[47] Beek WJ, Muttzall KMK, Heuven JW van. Transport phenomena. 2nd ed. Chichester ; New York: Wiley; 1999.

[48] van Bommel MJ, de Haan AB. Drying of silica gels with supercritical carbon dioxide. J Mater Sci 1994;29:943–8. https://doi.org/10.1007/BF00351414.

[49] Budisa N, Schulze-Makuch D. Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment. Life Open Access J 2014;4:331–40. https://doi.org/10.3390/life4030331.

Troisième partie : Caractérisation des mousses sèches de lysat plaquettaire *in vitro* et *in vivo*

L'hydrogel composé de lysat plaquettaire, de chlorure de calcium, d'acide tranexamique et de chlorure de sodium a pu être séché par CO_2 supercritique avec succès. Le procédé complet ayant été validé, la suite de ce travail décrit la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de la mousse obtenue. L'élaboration de ce matériau a pour objectifs de rendre l'utilisation du lysat plaquettaire plus facile du point de vue de sa manipulation et de permettre sa conservation dans le temps. Les premières caractérisations entreprises sur la structure de la mousse et ses propriétés physico-chimiques sont destinées à étudier particulièrement ces propriétés de manipulation et de conservation.

Les échantillons produits pour les expérimentations décrites ci-après (sauf mention contraire) ont été conçus à partir de gels de 1 mL constitués dans des récipients en verre cylindriques. Les échantillons séchés conservent la forme de cylindres de 7 mm de diamètre.

I. Matériels et méthodes

1. Caractérisation de la structure interne du matériau

Microscopie Electronique à Balayage

Les échantillons ont été analysés au Microscope Electronique à Balayage (Quanta 250 FEG FEI, Thermo Scientific®, Etats-Unis) sans et avec métallisation pour observer le réseau de fibres de fibrine créé ainsi que l'état de surface. Avant analyse, les échantillons ont été collés sur un scotch carbone double face et la métallisation réalisée à l'or grâce à un évaporateur SI50B Sputter Coater (Edwards, UK).

Analyse dispersive en énergie (EDX) et Analyse par Diffraction des Rayons X (DRX)

Une analyse dispersive en énergie (EDX pour « *Energy Dispersive X-ray* ») a été conduite pendant les observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) sans métallisation, sous une atmosphère à pression 90 Pa (X Flash 6 | 13, Bruker®, Etats-Unis). Les analyses réalisées par spectromètre des rayons-X (EDX) permettent d'obtenir la composition élémentaire qualitative ou semi-quantitative de très petites zones.

D'autre part, la diffractométrie de rayons X (DRX), qui consiste à mesurer l'angulation et l'énergie des rayons diffractés suite à l'envoi sur un échantillon (préparé sous la forme d'une poudre aplanie) d'un faisceau de rayons X, a été effectuée sur un diffractomètre INEL Equinox 1000 en utilisant une anticathode au cobalt (Kα = 1,788970 Å) sous 40 mA et 40 kV. Les spectres ont été enregistrés en mode rasant sur une gamme d'angles 2θ de 3 à 80°, avec un pas de 0,02° et un temps de comptage de 2s (des artefacts à 8° et 14° sont parfois notés du fait de la présence du porte échantillon en silicium adapté aux faibles quantités de poudre). Bien que les résultats obtenus sur les structures amorphes ne permettent pas leur identification, la DRX servira à l'identification des cristaux formés, même s'ils ne le sont que partiellement.

Analyse spectroscopique FTIR

La Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) a été réalisée sur les échantillons et comparée au spectre du principal constituant de l'hydrogel : le lysat plaquettaire. Cette technique permet d'obtenir le spectre d'absorption de rayons infrarouges qui avaient été envoyés au travers de l'échantillon [1]. Des pastilles ont été élaborées avec 1 mg de poudre de la mousse à analyser et 350 mg de KBr puis mises en forme sous 8 tonnes de pression. Les analyses ont été réalisées dans une gamme de 400 à 4000 cm^{-1} (appareil Perkin

Elmer Spectrum One) et les données analysées à l'aide des logiciels Omnic 9.6 (ThermoFisher) et Excel 2010 (Microsoft Office).

Analyse de la porosité par porosimétrie à mercure

6 mousses sèches de lysat plaquettaire ont été placées dans une cellule de conductance d'un porosimètre à mercure (Autopore III, Micromeritics®, Etats-Unis). La cellule ensuite remplie de mercure subit une augmentation de pression qui induit l'intrusion du mercure à l'intérieur du réseau poreux. Le taux d'intrusion du mercure permet de déterminer la porosité totale de l'échantillon tandis que le rapport intrusion/pression permet d'obtenir la distribution de la taille des pores. L'appareil utilisé permet une caractérisation de pores dont les diamètres sont compris entre 3 nm et 360 µm.

Ici comme dans plusieurs autres tests effectués dans ce travail, les résultats obtenus sur les mousses ont été comparés à ceux obtenus sur des hydrogels imprégnés d'acétone mais laissés à sécher sous une hotte à flux laminaire sans passage en atmosphère CO_2. Le procédé, appelé « séchage évaporatif », est déjà validé dans la littérature et permet l'obtention d'un matériau appelé « xérogel » [2].

2. Humidité résiduelle

La mesure de l'humidité résiduelle des échantillons permet d'anticiper la conservation du matériau en évitant sa déformation liée à l'évaporation d'une phase aqueuse résiduelle ou les risques liés au développement bactérien.

Taux d'humidité résiduelle

Le taux d'humidité résiduelle a été mesuré avec une balance à infrarouges (Moisture Analyzer IR-60, Denver Instrument®, Etats-Unis) chauffant à 105 °C. Il correspond à la différence entre la masse mesurée à température ambiante et celle obtenue après chauffage de l'échantillon.

Analyse Thermogravimétrique (ATG)

6 mg de mousse sèche de LP ont été soumis à une analyse thermogravimétrique (TGAQ50 (TA Instruments, New Castle, DE) en atmosphère Argon sur une gamme de températures comprises entre 25 et 600 °C au rythme de 5 °C par minute. La perte de masse en fonction de la température permet de déterminer le taux d'humidité résiduelle des échantillons [3].

3. La cinétique d'hydratation et le taux d'imprégnation hydrique

Le taux de réhydratation ou d'imprégnation hydrique détermine la capacité du matériau à se ré-imprégner de liquide après avoir été séché.

La cinétique de réhydratation des mousses a été suivie selon le protocole détaillé dans la Figure 28. De façon simplifiée, l'échantillon est trempé dans 20 mL d'eau distillée et pesé à intervalles réguliers après élimination de la solution aqueuse de trempage grâce à une pompe à vide.

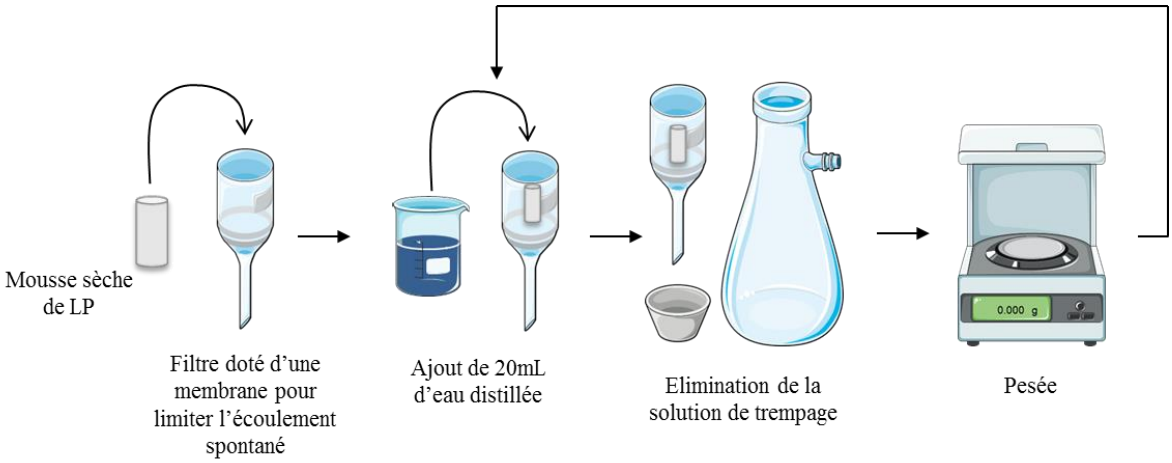

Figure 28 : Représentation schématique du dispositif mis en œuvre pour suivre la cinétique de réhydratation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire.

La différence entre le poids initial (du matériau sec) et le poids final (du matériau imbibé) a permis de calculer le taux de réhydratation grâce à la formule suivante :

$$\text{Taux de réhydratation (en \%)} = \frac{(poids\ final - poids\ initial)}{poids\ initial} \times 100$$

Le suivi de l'évolution du taux de réhydratation au cours du temps nous permettra de déterminer la cinétique d'hydratation. Le taux d'hydratation maximal obtenu a été comparé à celui d'échantillons témoins séchés par évaporation sous hotte à flux laminaire.

4. Résistance mécanique : essais de compression

16 échantillons cylindriques de 8 mm de haut et 7 mm de diamètre ont été testés en compression sur un texturomètre (TA.XT Plus Texture Analyzer, Texture Technologies®, Etats-Unis) avec une mise en charge constante à 2 mm/min jusqu'à obtenir une compression de 60 % du volume initial [4]. Afin de témoigner de la meilleure maniabilité des mousses sèches, celles-ci ont été comparées aux hydrogels initiaux qui n'ont pas été séchés par quelque

moyen que ce soit et à des mousses réhydratées par trempage pendant 24 h dans 1000 µL d'eau distillée.

5. CO_2 supercritique et stérilisation

Note : les tests d'évaluation de la stérilité ont été réalisés sous contrat par Mme Cathy FEUILLOLAY, responsable des essais dans le secteur Microbiologie au sein de la FONDEREPHAR (35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex 09).

Avant d'envisager toute évaluation biologique de la biocompatibilité et de la bioactivité du matériau, des essais d'évaluation de sa stérilité ont été entrepris.

Le recours au CO_2 supercritique est un procédé de stérilisation déjà proposé dans la littérature sur plusieurs dispositifs médicaux implantables allogènes [5]. Un effet stérilisant a en effet déjà été démontré notamment sur des matrices dermiques porcines [6], des membranes amniotiques humaines [7], des extraits pulmonaires de rats [8], ou encore des valves aortiques porcines [5].

Cependant les conditions déjà évaluées sont différentes de celles appliquées dans le protocole de séchage des mousses sèches [9,10] : aucun des protocoles n'est destiné à sécher le biomatériau en même temps qu'il est stérilisé. Il est ainsi systématiquement ajouté dans l'enceinte du stérilisateur un récipient contenant une solution décontaminante à base d'acide péracétique et/ou éventuellement du peroxyde d'hydrogène. Les *Bacillus Atropheus* et *Staphylococcus Epidermidis* y sont notamment sensibles.

La norme ISO 11737-2 concernant les « contrôles de stérilité pratiqués au moment de la définition, de la validation et de la maintenance d'un procédé de stérilisation » stipule notamment que ledit procédé doit avoir un effet sur les spores de *Bacillus stearothermophilus*

(microorganisme de choix pour établir une comparaison avec la stérilisation par autoclave), de *Bacillus pumilus* (microorganisme de choix pour établir une comparaison avec la stérilisation par irradiation) et de *Bacillus atrophaeus* (microorganisme de choix pour établir une comparaison avec la stérilisation par oxyde d'éthylène). Une réduction significative et suffisante de la présence de ces espèces a été démontrée par exemple avec un procédé utilisant le CO_2 supercritique sous 8,5 MPa de pression (soit 85 bar) pendant 40 minutes à une température de 38 °C, en présence de 0,25 % d'H_2O, de 0,15 % de H_2O_2 et de 0,5 % d'acide péracétique [11]. Il apparaît en effet dans la littérature que la présence d'un récipient dans le sécheur à CO_2 contenant du peroxyde d'hydrogène et de l'acide péracétique est largement retrouvée [5]. Toutefois, la présence d'une telle solution est incompatible avec l'utilisation du CO_2 supercritique comme moyen de séchage en plus de la stérilisation. Qu'en est-il alors des conditions appliquées pour le séchage des mousses de lysat plaquettaire sous 90 bar de pression à 43 °C pendant 4 heures ?

La première étape en vue d'évaluer la stérilité des mousses sèches a été de valider la future méthode d'évaluation. Pour cela, des mousses (n=18) conçues plusieurs mois auparavant, éventuellement déjà utilisées pour divers essais, et stockées dans des contenants non stériles ont été utilisées. L'analyse préalable de la biocharge présente naturellement sur les échantillons n'ayant pas été réalisée, les choix des milieux de culture et des conditions d'incubation ont été faits sur la base des indications du chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne 9ème Edition (PE9E) (2019) afin de permettre la croissance de l'ensemble des microorganismes (flore aérobie et anaérobie). L'ensemble des expérimentations présentées ci-dessous a été réalisé sous hotte à flux laminaire, après décontamination des surfaces et des contenants des échantillons, et par des opérateurs portant des gants stériles. Trois groupes de

microorganismes représentatifs des populations totales d'espèces ont été sélectionnés (toujours selon les préconisations de la PE9E) :

- Groupe des bactéries aérobies : *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82.118, *Bacillus subtilis* CIP 52.62 ;
- Groupe des bactéries anaérobies : *Clostridium sporogenes* CIP 79.3 ;
- Groupe des moisissures et levures : *Candida albicans* DSM 13.86, *Aspergillus brasiliensis* CBS 733.88.

Les cultures ont été effectuées selon un système de lot de semence, tels que les microorganismes utilisés pour l'inoculation n'aient pas subi plus de 5 passages à partir du lot de semence primaire. Ce système répond aux exigences de la norme NF EN 12353 :2013. Les suspensions ont été préparées extemporanément dans du tryptone-sel, à 108 UFC/mL pour les bactéries, à l'exception de *B. subtilis*, et à 107 UFC/mL pour les levures et moisissures. Pour *B. subtilis*, une suspension de spores préparées au laboratoire, titrée et conservée à -20 °C a été utilisée. Des dilutions au 1/10ème ont ensuite été réalisées afin d'obtenir des concentrations à 103 UFC/mL pour chacun des microorganismes. Des témoins de comptage ont été réalisés afin de contrôler l'inoculum utilisé.

Le dénombrement des bactéries aérobies a été mené sur gélose Trypcase-soja, par étalement de 100µL de la suspension à 103 UFC/mL (incubation des boites à 32,5 ± 2,5 °C pendant 24 à 48 heures). Le dénombrement de *Clostridium sporogenes* a été réalisé sur gélose Columbia + 5% de sang de mouton, par étalement de 100 µL de la suspension à 103 UFC/mL (incubation des boîtes à 32,5 ± 2,5 °C pendant 24 à 48 heures). Le dénombrement des levures et moisissures a été réalisé sur gélose de Sabouraud, par étalement de 100 µL de la suspension à 103 UFC/mL (incubation des boîtes à 22,5 ± 2,5 °C pendant 48 à 72 heures).

La compatibilité des échantillons avec cette méthode d'évaluation a été évaluée par la méthode de l'immersion directe dans des bouillons nutritifs (Annexe A de la norme NF EN

ISO 11737-2 : Janvier 2010, Paragraphe A.6.1). Ces bouillons nutritifs utilisés ont été introduits en quantité suffisante (100mL) pour assurer un contact optimal avec les échantillons soumis à l'essai et des pools de 3 échantillons par type de bouillon ont été constitués. Pour chaque microorganisme-test, deux flacons (un de bouillon Trypcase-soja et un de bouillon thioglycolate) ont été inoculés à l'aide de 10 à 100 UFC du microorganisme en question (=100 µL d'une suspension à 103 UFC/mL). Un témoin positif pour chaque microorganisme-test ainsi qu'un témoin négatif (bouillon seul) ont été constitués. Une fois l'inoculation réalisée, les flacons ont été placés dans les conditions présentées dans le Tableau 7. Après 3 ou 5 jours d'incubation selon les microorganismes, les différents bouillons ont été examinés afin de détecter la présence d'une turbidité, démontrant la croissance des inoculi introduits et donc permettant la validation des conditions d'essai.

Tableau 7 : Flacons nutritifs contenant les microorganismes d'essai.

Microorganisme d'essai	Milieu nutritif	Température d'incubation	Temps maximum d'incubation
S. aureus	Bouillon Thioglycolate	32,5°C	3 jours
P. aeruginosa	Bouillon Thioglycolate	32,5°C	3 jours
C. sporogenes	Bouillon Thioglycolate	32,5°C	3 jours
A. brasiliensis	Bouillon Trypcase-soja	22,5°C	5 jours
C. albicans	Bouillon Trypcase-soja	22,5°C	5 jours
B. subtilis	Bouillon Trypcase-soja	22,5°C	5 jours

Les résultats de la phase d'inoculum et de l'incorporation des échantillons dans les bouillons sont présentés respectivement dans les Tableaux 8 et 9. Pour l'ensemble des 6 microorganismes-tests ainsi que pour chaque témoin positif réalisé, une croissance a été observée. Le contrôle de la stérilité a donc été validé comme réalisable par la technique d'immersion directe. Lors des évaluations, l'incubation des bouillons nutritifs est prévue pour être allongée à 14 jours comme préconisé dans l'annexe A de la norme NF EN ISO 11737-2 : Janvier 2010, paragraphe A.6.7.

Tableau 8 : Résultats de l'inoculum présentés selon la moyenne des dénombrements réalisés en duplicat pour chaque microorganisme test.

Microorganisme-test SLC N°101	Moyenne des dénombrements
S. aureus	90
P. aeruginosa	64
C. sporogenes	74
A. brasiliensis	26
C. albicans	72
B. subtilis	74

Tableau 9 : Résultats de l'incorporation des échantillons dans les bouillons pour valider la méthode d'évaluation de la stérilité.

	Bouillon + échantillon	Témoin positif	Témoin négatif
S. aureus	+	+	-
P. aeruginosa	+	+	-
C. sporogenes	+	+	-
A. brasiliensis	+	+	-
C. albicans	+	+	-
B. subtilis	+	+	-

Les échantillons ont été sortis de l'enceinte du sécheur en présence d'un bec bunzen. La méthode par immersion directe décrite précédemment a été appliquée pour l'évaluation de la stérilité avec deux bouillons nutritifs (Trypocase-soja maintenu à 22,5 ± 2,5 °C et Thioglycolate + rézasurine maintenu à 32,5 ± 2,5 °C). Un pool de trois échantillons par type de bouillon a été systématiquement constitué. La stérilité et la fertilité de chaque bouillon nutritif ont été soumises à contrôle, de même que la stérilité de la hotte à flux laminaire qui a été contrôlée par la réalisation de prélèvement et sédimentation sur géloses.

6. Suivi de la dégradation en milieu aqueux

Spectrométrie ultraviolet-visible (UV)

La dégradation des mousses en milieu aqueux a été suivie par trempage dans une solution de 25 mL de NaCl à 0,9% et quantification régulière des protéines libérées à l'aide d'un spectromètre UV (7315 Spectrophotometer, Jenway). Pour cela, 3mL de la solution de trempage ont été prélevés à des temps réguliers, déposés dans la cuve quartz du spectromètre pour réalisation de l'analyse puis remis dans le bain de trempage. Nous avons lancé à chaque temps une mesure d'absorbance sur une gamme de longueurs d'ondes allant de 200 à 500 nm et relevé la valeur du pic d'absorbance à 280 nm. Bernal et *al.* ont en effet validé qu'aucun autre élément que des protéines contenues dans le lysat plaquettaire n'était détectable à cette longueur d'onde [12]. Le blanc était réalisé sur la machine avant chaque mesure avec du NaCl à 0,9 % identique à celui utilisé dans la solution de trempage.

Les intensités obtenues sur des gels et des mousses totalement dégradés (par action mécanique) sont considérées comme correspondantes à une dégradation totale de 100%. Les taux de dégradation obtenus pour chacun des matériaux seront représentés par rapport à la capacité de dégradation finale de 100% présentée précédemment.

7. Propriétés biologiques : bioactivité et biocompatibilité

Cinétique de libération des facteurs de croissance en milieu aqueux

8 mousses et 2 hydrogels de lysat plaquettaire ont été trempés dans 1200 µL de PBS durant trois semaines et les volumes de surnageant ont été collectés et renouvelés à différents temps. Les prélèvements ont été congelés à -20 °C jusqu'à analyse. Des tests ELISA (méthode immuno-enzymatique en anglais « *Enzyme-Liked Immunosorbent Assay* ») avec mesure de l'absorbance à 450 nm ont été menés sur chaque échantillon en duplicat pour doser la

libération du VEGF au cours du temps (Human VEGF Pre-Coated ELISA Kit, PeproTech®, Etats-Unis). En parallèle, les échantillons ont été pesés sur balance de précision pour suivre l'évolution de leur dégradation dans le milieu.

Le principe de la méthode d'analyse par ELISA repose sur la reconnaissance d'antigènes par des anticorps [13]. La procédure comprend en réalité deux anticorps : le premier est spécifique de l'antigène à reconnaître et le second est spécifique du complexe formé par le premier anticorps et son antigène. Ce second étant lié à une enzyme responsable de fluorescence, il pourra en être révélé la présence par la mise en contact d'un agent fluorogène activé par ladite enzyme. Le protocole est réalisé sur plaque de 96 puits et débute par le remplissage des puits avec les solutions dans lesquelles se trouve le VEGF. Le kit étant spécifique au dosage de ce facteur de croissance, la surface du fond des puits est déjà recouverte des anticorps anti-VEGF humain et il n'y a donc pas besoin de réaliser la fixation préalable de ces anticorps avant le début de l'expérimentation. Une gamme étalon est prévue sur la plaque. Tous les puits sont testés en duplicat. Après un temps de repos défini permettant la formation des complexes antigène/anticorps, une vidange des puits est entreprise puis la plaque est rincée pour éliminer les débris non retenus qui risqueraient de fausser l'analyse spectrale finale. Les solutions riches en anticorps couplés aux enzymes sont ensuite déposées dans les puits et un temps de contact défini par le fabricant est respecté. Les puits sont de nouveau rincés et une dernière solution contenant le fluorochrome substrat de l'enzyme est ajoutée dans chaque puit. Le signal est visible à l'œil nu (Figure 29) mais sa quantification nécessite un lecteur d'absorbance.



Figure 29 : Réalisation de la gamme étalon du dosage du VEGF par technique ELISA. Chaque puit est réalisé en duplicat (A1 et E1 ici par exemple correspondent aux puits les plus concentrés à 500 pg/mL).

Biocompatibilité du matériau

Note : Ces tests ont été réalisés par le laboratoire PHY-OS (UMR 1238, Université de Nantes), sous la responsabilité de M. Pierre LAYROLLE. L'intégralité des résultats ne peut pas être présentée dans ce travail en raison des contraintes imposées par l'épidémie de Covid-19 sur la poursuite des activités du laboratoire.

Des mousses sèches de lysat plaquettaire ont été produites sous forme rectangulaire et découpées de façon à être réparties dans des plaques de culture cellulaire de 24 (n=4) ou de 96 puits (n=4).

Pour les essais de biocompatibilité, 200 000 cellules stromales mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse humaine (BM-CSM) ont été déposées dans chaque puits pour les plaques de 24 puits, ainsi que 600 µL de milieu (α-MEM, 10% sérum de veau fœtal, 1% pénicilline-streptomycine). Après la première nuit d'adhésion, 1mL de milieu a été rajouté dans chaque puit et la culture s'est poursuivie durant 21 jours avec changement de milieu tous les 3 jours. Des plaques sans mousses ont été prévues en guise de contrôle. La viabilité et la prolifération des cellules a été observée en microscopie à l'aide de tests LIVE&DEAD. Pour cela les milieux de culture sont remplacés par une solution de PBS avec 0,2 µM de calcéine et 0,2µM de bromure d'éthidium homodimère. Une incubation à 37°C pendant 30 minutes précède l'observation au microscope confocal. La détection des émissions des deux fluorophores du marquage LIVE&DEAD se fait de façon simultanée.

Implantations *in vivo*

Les tests préliminaires ont été réalisés avec l'aide du Dr. Paul MONSARRAT du laboratoire STROMALab (Toulouse, France). Les coupes histologiques ont été réalisées par Mme Marie-Paule LACOMBLET et leur interprétation avec les aides précieuses du Dr. Paul MONSARRAT et du Pr. Philippe KEMOUN.

Après séchage au CO_2 supercritique, 2 mousses sèches de lysat plaquettaire ainsi que 2 contrôles séchés par évaporation ont été implantés sous anesthésie générale chez 2 souris « *nude* » dépourvues de système immunitaire (étant donné l'origine humaine du lysat plaquettaire). Deux incisions cutanées (une de chaque côté de la colonne vertébrale) ont été réalisées chez les souris anesthésiées au protoxyde d'azote puis les tissus sous-cutanés ont été disséqués. Les biomatériaux ont ensuite été placés sous le fascia musculaire sous-cutané et les plaies suturées. Chaque souris a ainsi reçu une mousse séchée par CO_2 supercritique et un contrôle (Figure 30).

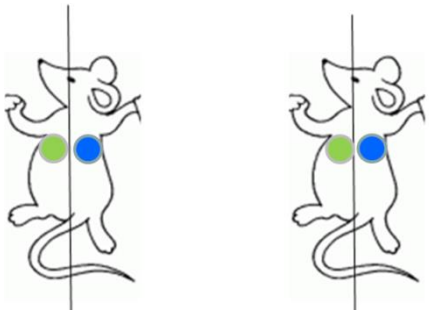

Figure 30 : Schéma résumant les implantations sous-cutanées chez les deux souris « nude ». Les matériaux verts correspondent aux mousses sèches de lysat plaquettaire ; les contrôles sont représentés en bleu.

Les souris ont ensuite été sacrifiées deux semaines après l'implantation et des analyses histologiques ont été menées avec des colorations au trichrome de Masson et à l'hémalun-éosine pour mettre en évidence l'importance des réactions inflammatoires et l'évolution de la vascularisation sur les sites de greffe.

8. Analyses statistiques

Les données de l'ensemble de ces expérimentations ont été collectées et traitées à l'aide des logiciels Microsoft Excel 2010® (Microsoft, Etats-Unis), Stata v.13® (Stata Corp, Etats-

Unis) et Prism 5® (GraphPad, Etats-Unis). Les variables qualitatives ont été analysées à l'aide de tests de Fisher et les variables quantitatives à l'aide de t-tests de Student ou des tests non-paramétriques de Mann-Whitney Wilcoxon si les conditions d'application des t-tests n'étaient pas respectées (distribution normale et égalité des variances).

II. Résultats

1. Caractérisation de la structure interne du matériau

Microscopie Electronique à Balayage

Le réseau de fibrine conserve une organisation tridimensionnelle poreuse après séchage au CO_2 supercritique (Figure 31 – gauche). La Microscopie Electronique à Balayage permet d'observer les polymères de fibrine qui sont séparés par des espaces interconnectés dont la porosité est observable en surface (Figure 31 – droite).

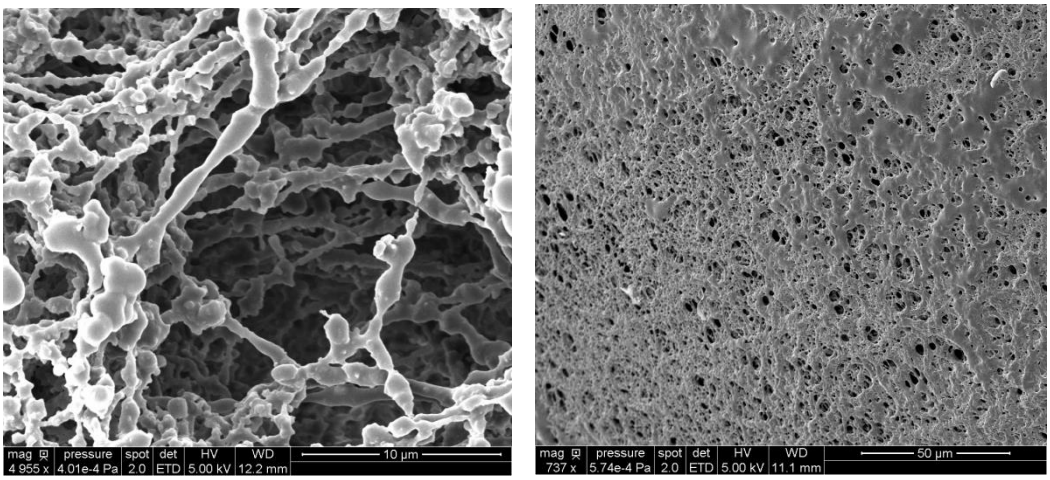

Figure 31 : Observations des mousses sèches de lysat plaquettaire au microscope électronique à balayage avec métallisation. L'image de gauche (grossissement x4955) est une observation du réseau de fibrine contenu dans un échantillon. L'image de droite (grossissement x737) met en évidence les pores du matériau en surface.

Analyse EDX et analyses DRX

L'analyse des mousses sèches de lysat plaquettaire effectuée par EDX montre qu'elles contiennent essentiellement du sodium, du chlore, et du calcium (Figure 32, Tableau 10). La détection de soufre provient de l'héparine (de formule $C_{12}H_{19}NO_{20}S_3$) ajoutée par les distributeurs de lysat plaquettaire pour limiter sa polymérisation spontanée. Une faible proportion d'aluminium est retrouvée sur les spectres mais provient en réalité de la chambre de l'appareil d'après les analyses réalisées sans échantillon. Ce spectre servira de référence pour étudier les modifications apportées au matériau dans la Quatrième Partie de ce travail.

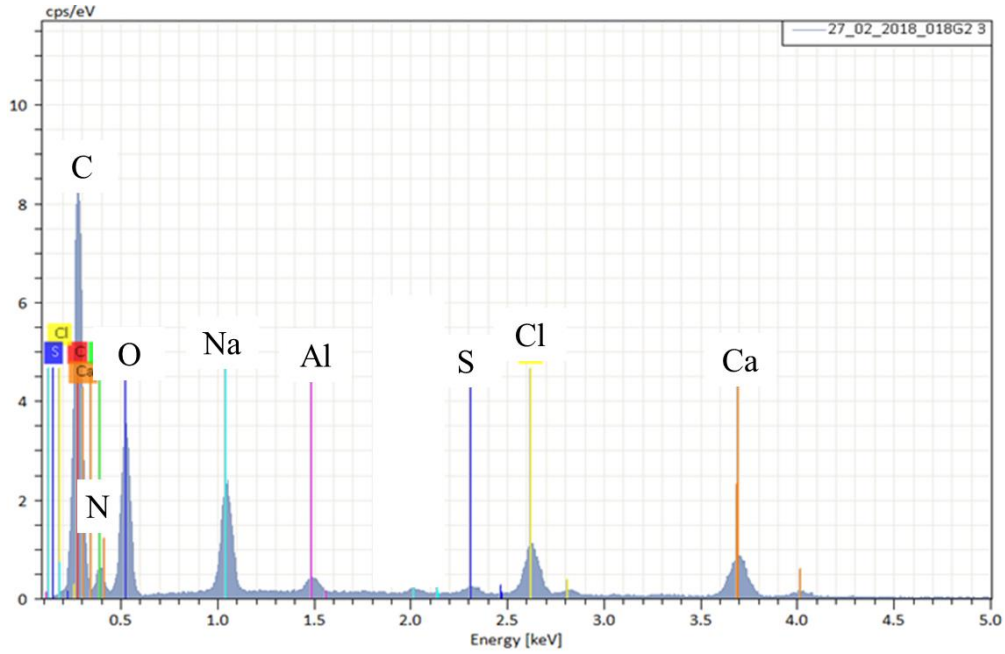

Figure 32 : Analyse dispersive en énergie (EDX) réalisée sur une mousse sèche de lysat plaquettaire. L'appareil (Bruker X Flash 613) détecte les pics correspondant aux différents éléments qui constituent le biomatériau.

Tableau 10 : Proportions des principaux éléments retrouvés dans les mousses sèches de lysat plaquettaire d'après les analyses EDX.

Eléments	Proportions (cps/eV)
Na	2,03 ± 0,77
Cl	0,91 ± 0,53
Ca	0,61 ± 0,34
S	0,28 ± 0,08

L'analyse EDX (Figure 33), confirmée par les analyses effectuées par DRX (Figure 34), a permis de révéler que les cristaux dispersés dans la structure fibreuse sont des cristaux de NaCl provenant de la recristallisation des sels de départ introduits dans la composition des hydrogels. Ils ne revêtent pas de réel intérêt pour une utilisation du matériau sec d'autant qu'ils seront facilement dissous lors de la réhydratation de la mousse en laboratoire ou après implantation *in vivo*. La formation de ces cristaux de NaCl pourra être limitée voire supprimée en substituant dans la composition du gel, la solution de NaCl par d'autres solutions riches en espèces actives différentes. Les expérimentations préliminaires consistant à substituer la solution de NaCl par une solution de $CaCl_2$ seront présentées dans la Quatrième Partie.

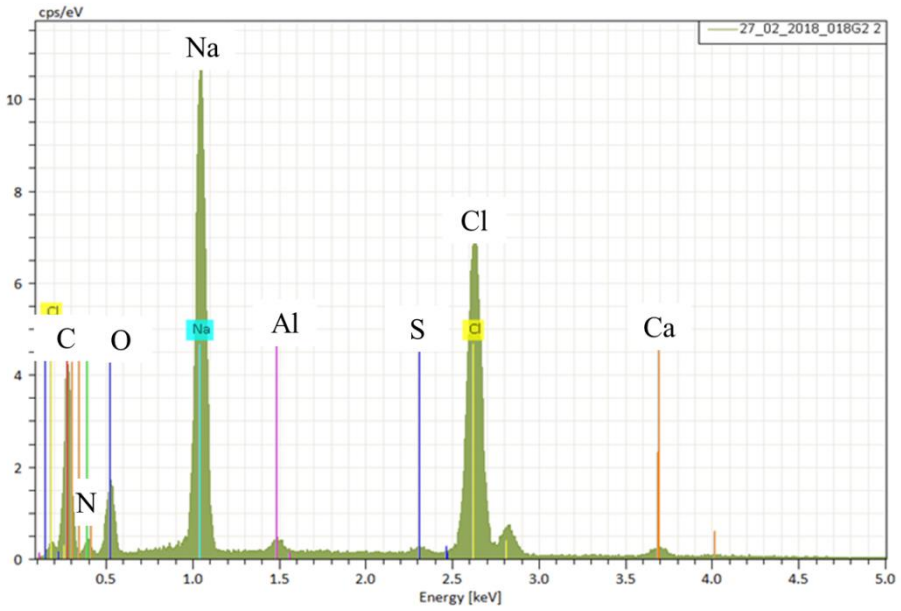

Figure 33 : Analyse dispersive en énergie (EDX) menée sur les cristaux présents dans le réseau de fibres.

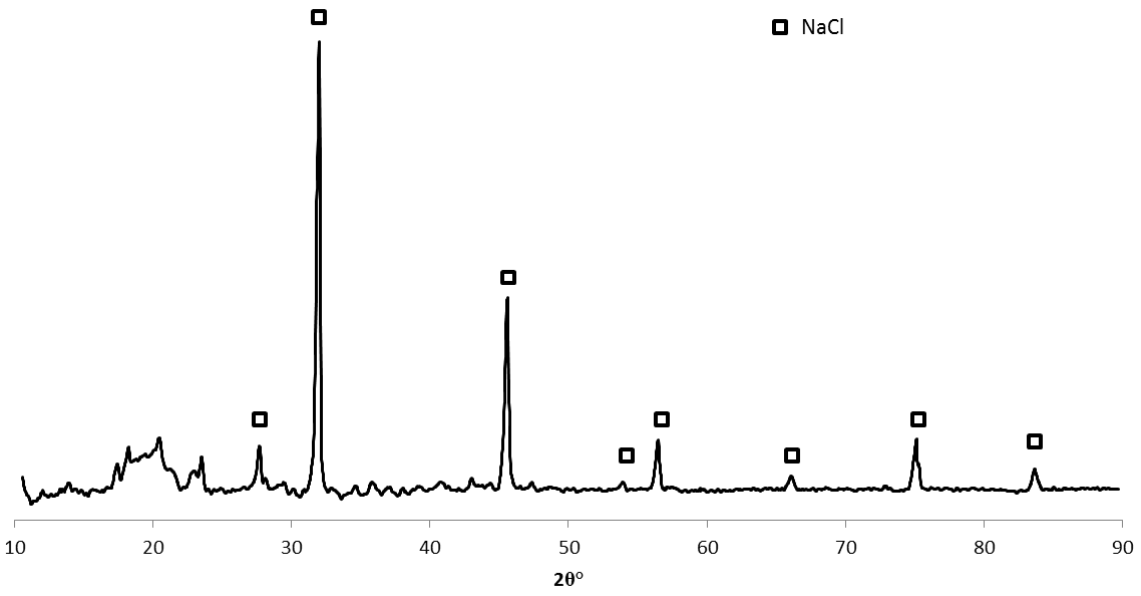

Figure 34 : Spectre DRX confirmant la présence de cristaux de NaCl dans le réseau de fibres. Les bandes associées à la présence de cristaux de NaCl sur la DRX ont été identifiées à l'aide de marqueurs ☐ issus de la fiche JCPDS 00-005-0628 (NaCl Halite).

Analyse Spectroscopique FTIR

Le spectre obtenu sur la mousse sèche de lysat plaquettaire présente des bandes semblables à celles obtenues avec le lysat plaquettaire seul (Figure 35). Les bandes correspondent aux amides de type I, II et III, respectivement positionnées dans les domaines 1600-1690cm^{-1} (correspondant aux amides I, étirement C = O), 1480-1575cm^{-1} (correspondant aux amides II, étirement CN, flexion NH) et 1229-1301cm^{-1} (correspondant aux amides III, étirement CN, flexion NH) [14].

Aucune différence significative des bandes n'est observée sur le spectre des mousses par rapport à celui obtenu avec le lysat plaquettaire.

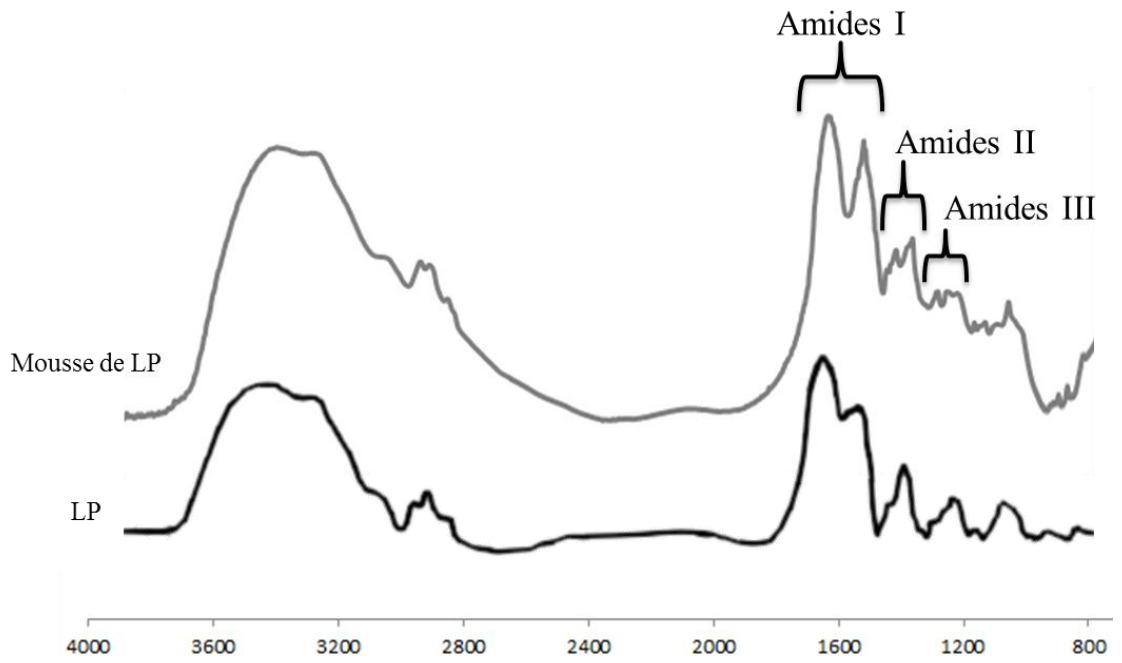

Figure 35 : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier menée sur la mousse sèche de lysat plaquettaire (LP) (courbe du haut) et comparée au spectre du lysat plaquettaire (courbe du bas) (données issues de la référence [15]).

Analyse de la porosité

Les mousses sèches de lysat présentent un taux de porosité total moyen de 83,42 ± 4,85 %. Les contrôles obtenus par séchage à l'air présentent en revanche un taux bien plus faible et plus variable de 5,93 ± 2,78 %. Cela confirme la densification de la structure du gel lorsque ce dernier est séché à l'air libre.

La contribution de chaque taille de pore est représentée dans le tableau 11. La distribution de la porosité en fonction de la taille des pores met en évidence une porosité majoritairement comprise entre 100 nm et 5 µm et une porosité comprise entre 5 µm et 100 µm. Les mousses sèches de lysat plaquettaire présentent en effet des pores dont les dimensions varient de 7 nm à 100 µm (Figure 36), mais la répartition des pores n'est pas homogène. 65,81 % du volume de la porosité dans les mousses est représenté par des pores dont le diamètre est compris entre 100 nm et 5 µm, c'est-à-dire des pores capables de laisser diffuser les fluides dans le matériau mais pas les éléments cellulaires et vasculaires (dont les diamètres dépassent les 10µm). Près

d'un tiers de la porosité totale (29,91 %) est en revanche représentée par des pores de diamètre compris entre 5 et 100 µm susceptibles de servir de voie d'accès aux cellules et aux néo-vaisseaux dans la structure du réseau de fibres.

Tableau 11 : Taux de porosité et répartition de la taille des pores par rapport à la porosité totale.

	Taux de porosité totale (%)	**360µm>∅>100 µm**	**100µm>∅>5 µm**	**5µm>∅>100 nm**	**100nm>∅>3nm**
Moyenne	83,42	2,46	29,91	65,81	1,83
Ecart-type	4,85	0,66	3,92	3,79	0,37

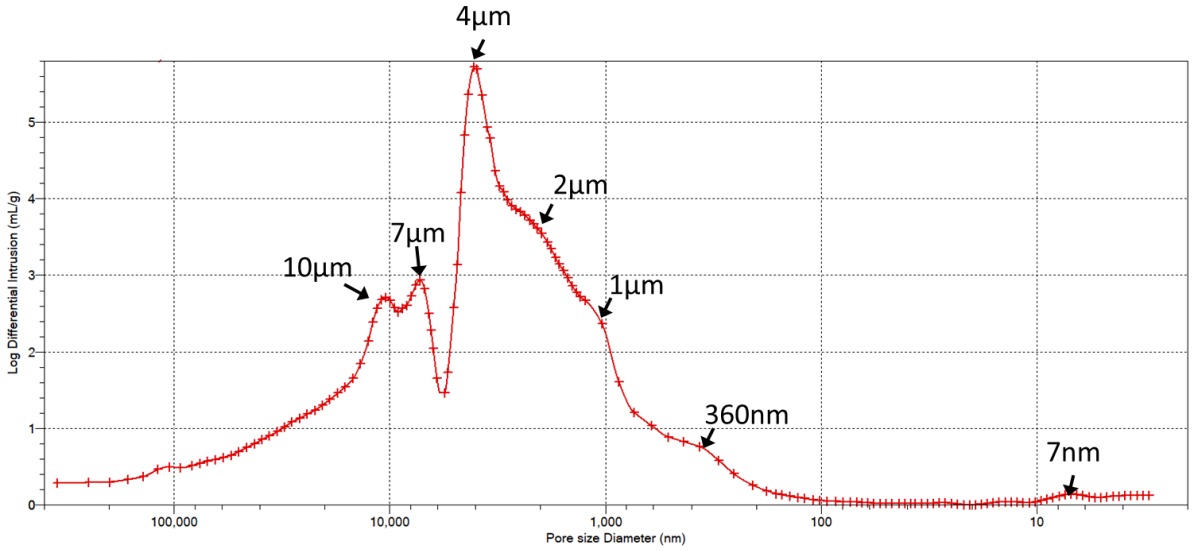

Figure 36 : Représentation graphique de la distribution des pores dans un échantillon de matériau séché au CO_2 supercritique.

Nous avons également souhaité évaluer les modifications de porosité engendrées par un changement dans la vitesse de dépressurisation lors du processus de séchage. Les résultats confirment qu'une dépressurisation lente (selon un gradient de 0,15 $bar.s^{-1}$) conduit à une réduction du diamètre des pores au sein du réseau de fibres (Figure 37).

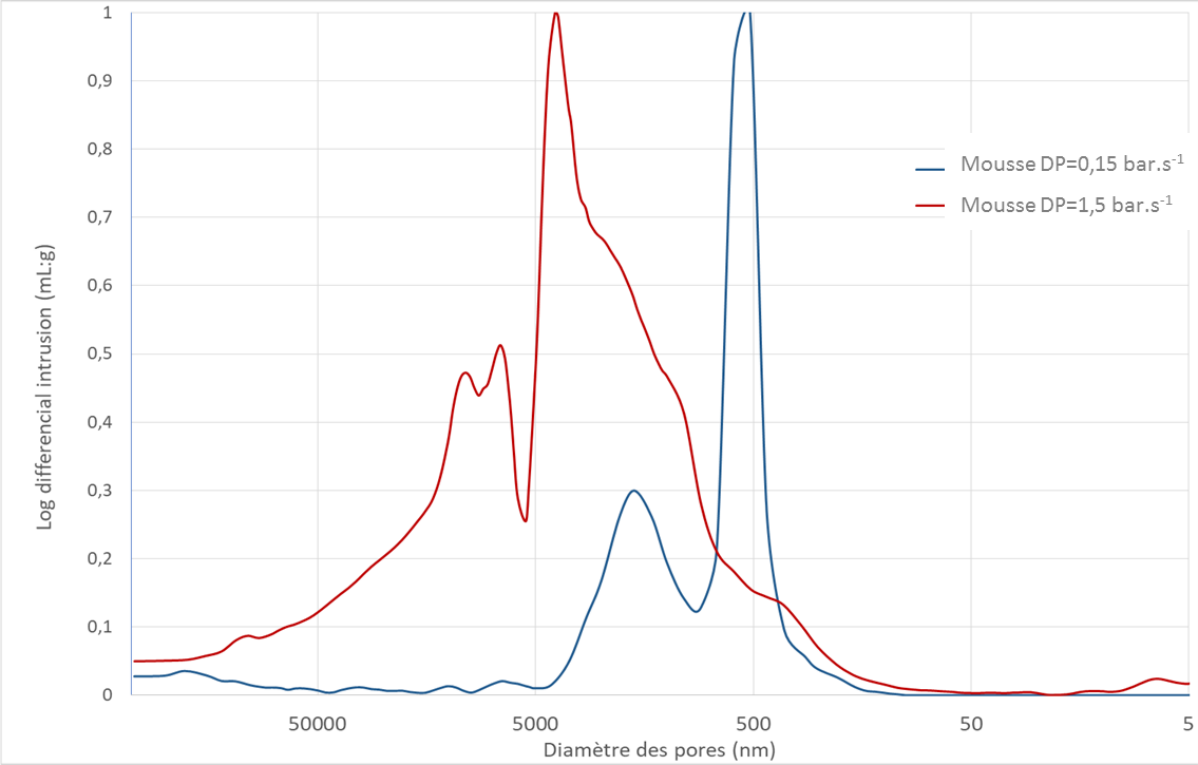

Figure 37 : Représentation graphique de la distribution des pores dans les mousses sèches de lysat plaquettaire obtenues selon deux gradients de dépressurisation différents (1,5 bar.s^{-1}en rouge ou plus lent 0,15 bar.s^{-1} en bleu).

Si la distribution de la taille des pores est intéressante pour anticiper et contrôler la diffusion des fluides et des cellules à l'intérieur du matériau, la distribution des volumes et surfaces accessibles pour une taille de porosité donnée est intéressante pour déterminer les volumes et les surfaces disponibles pour la croissance et la prolifération cellulaire (Tableau 12). Ainsi, l'ensemble du réseau poreux représente 5,35 cm^3 en volume et 94,1 m^2 en surface par gramme de mousse. A titre indicatif, les volumes et surfaces disponibles correspondant aux pores de diamètres 1 µm et 10 µm sont aussi présentés dans le tableau 12 mais il faut tenir compte du fait que l'accessibilité à ces pores par les cellules dépend aussi de l'élasticité des parois qui autorise la pénétration des cellules dans des pores de dimensions inférieures à leur taille. Des observations de microscopie électronique à balayage menées sur des hydrogels de LP dans lesquels des cellules stromales mésenchymateuses issues de tissu adipeux humain (ASC)

avaient été mises en culture ont montré la capacité de ces cellules à s'inclure dans le réseau de fibrine malgré une porosité inférieure au diamètre de la cellule (Figure 38).

Tableau 12 : Volumes et surfaces disponibles pour la croissance et la prolifération cellulaire selon le diamètre des pores dans les mousses sèches de lysat plaquettaire.

Diamètre des pores	Volume (cm^3/g)	Surface (m^2/g)
10µm	0,96 ± 0,25	0,18 ± 0,04
1µm	4,52 ± 0,28	5,66 ± 0,32
Total (360µm-3nm)	5,35 ± 0,31	94,1 ± 14,5

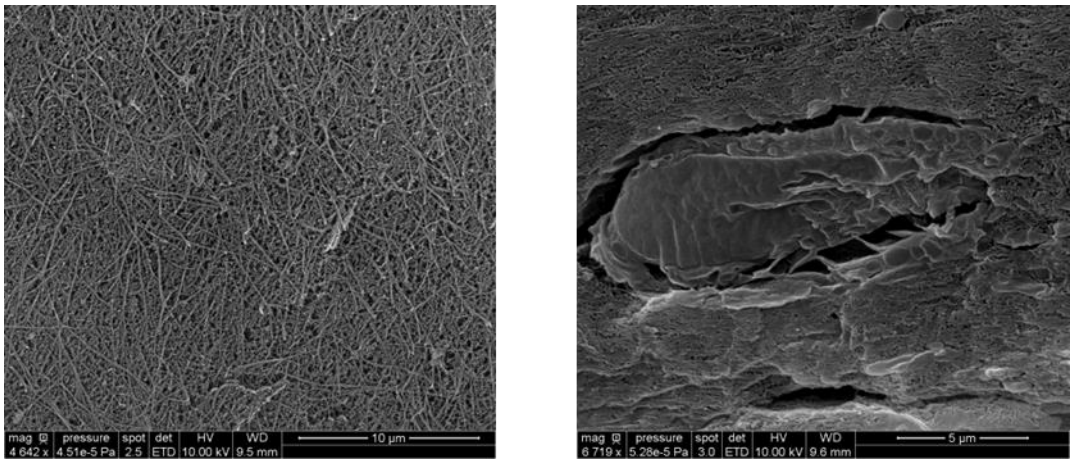

Figure 38 : Observation d'un hydrogel de lysat plaquettaire (à gauche) support de culture de cellules stromales mésenchymateuses issues de tissu adipeux (à droite) au microscope électronique à balayage environnemental après cryofixation.

La porosité de nos mousses sèches de LP ainsi que les surfaces disponibles pour la prolifération des CSM mises en culture sur le matériau ouvrent la voie à l'utilisation de la mousse en support d'expansion cellulaire dans le cadre de la thérapie cellulaire. Ce point sera discuté dans la Cinquième partie.

2. Humidité résiduelle

Taux d'humidité

Le procédé de séchage au CO_2 supercritique permet d'éliminer la phase liquide du gel (représentée par l'acétone), ce qui correspond à plus de 95 % du poids des matériaux (97,9 ± 1 %, n=20).

La qualité du séchage est semblable à celle d'une dessiccation à l'air. Les échantillons séchés au CO_2 supercritique présentent un taux d'humidité résiduel moyen de 4,11 ± 0,62 % qui ne diffère pas du taux d'humidité résiduel obtenu sur les échantillons contrôles conçus par séchage à l'air (4,24 ± 1,62 % (p=0,78)).

Les différences entre les deux méthodes de séchage concernent le volume et la porosité des échantillons. Les mesures réalisées au porosimètre à mercure sur les échantillons séchés à l'air et les échantillons séchés par CO_2 supercritique ont permis de montrer que le séchage par évaporation a mené à l'obtention d'un matériau de volume 8,25 fois inférieur à celui séché par CO_2 supercritique (Tableau 13).

Tableau 13 : Volume apparent déterminé sur 6 échantillons à l'aide du porosimètre à mercure sous vide (0,52 psi).

	Volume massique ν (cm^3/g)
Gel séché à l'air (séchage par évaporation)	0,77
Gel séché en atmosphère CO2 supercritique	6,35

Cela est dû à l'apparition de fortes tensions capillaires qui rapprochent les fibres les unes des autres. Elles sont liées à la présence d'une interface liquide-vapeur sur le site même de l'évaporation (Figure 39) (ces tensions sont modélisées par l'équation de Laplace-Young [16] mais ne seront pas détaillés dans ce travail). Les fissurations sont liées aux flux de solvant qui

se créent dans la matrice lors de l'évaporation. Ces flux diffèrent selon les sites plus ou moins externes ou internes du réseau poreux, sachant qu'ils peuvent eux-mêmes être modifiés lorsque des tensions capillaires ont déjà commencé à apparaître. Des contraintes sont ainsi appliquées sur les fibres du fait des flux de solvant et des réorganisations engendrées par les phénomènes de tension capillaire. L'architecture initiale du réseau est condensée, les polymères se rapprochent les uns des autres, se rompent sous l'effet des contraintes et la porosité s'en trouve réduite.

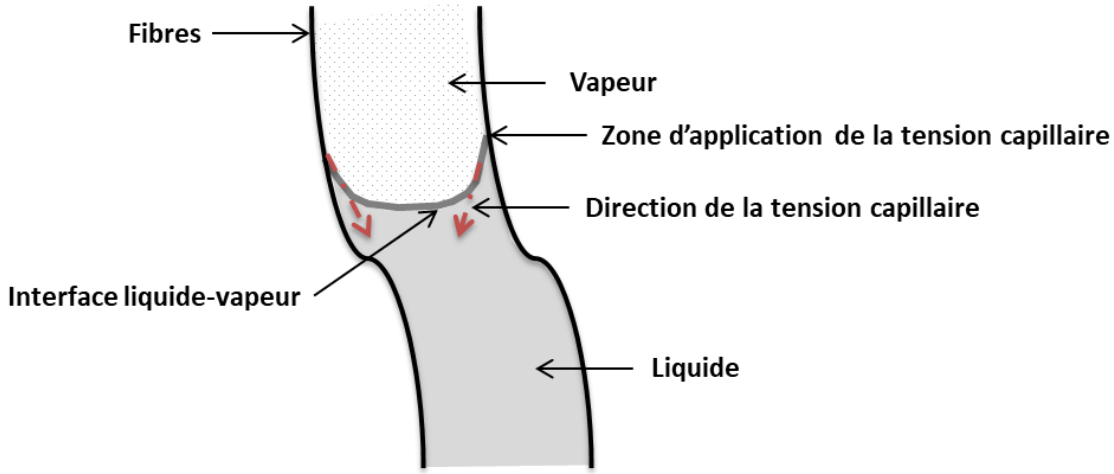

Figure 39 : Schématisation de la tension capillaire qui se crée à l'interface liquide vapeur.

Analyse Thermogravimétrique

Le taux d'humidité de la mousse sèche de LP déterminé par ATG est approximativement de 4,5% (Figure 40). Cela est concordant avec les données précédentes issues des mesures à la balance à infrarouge.

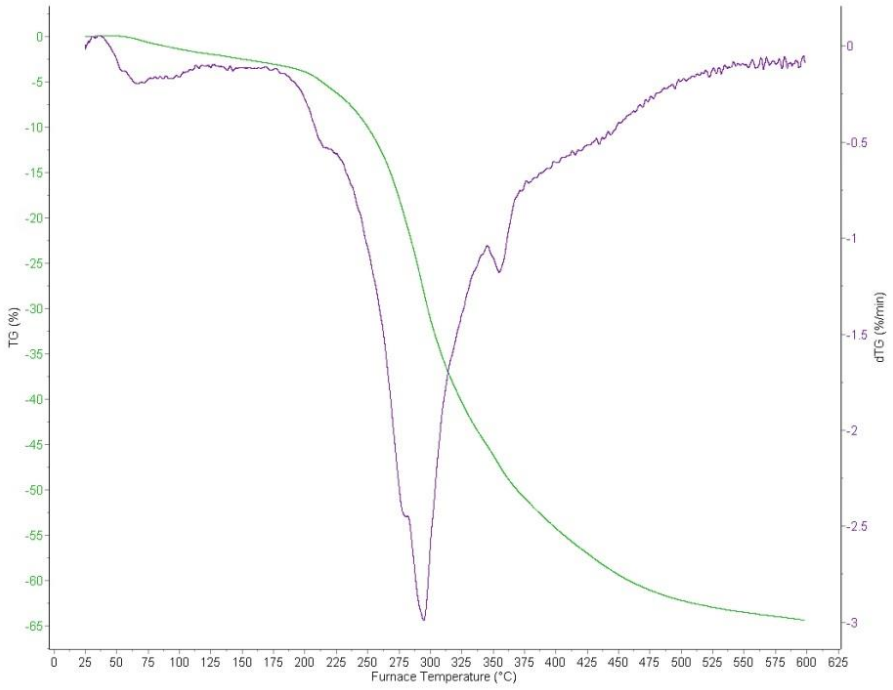

Figure 40 : Courbe de dégradation thermique (en violet) de la mousse sèche de lysat plaquettaire et sa dérivée (en vert).

Les résultats montrent également que la dégradation principale du matériau survient entre 200 et 500 °C avec un pic à 294,67 °C. Cela nous permet de confirmer qu'il n'y a pas de dégradation majeure du réseau de fibres lors de la soumission des échantillons à une température de 105 °C dans la balance à infrarouges.

3. Taux d'imprégnation hydrique

Les échantillons séchés au CO_2 supercritique ont atteint une capacité à se réhydrater de l'ordre de 1798 ± 40,2 % à 24h, c'est à dire qu'ils possèdent un potentiel très important à s'imbiber lorsqu'ils sont placés en milieu aqueux (Figure 41). Les témoins séchés à l'air ne présentent un taux de réhydratation à 24h que de 273,3 ± 30,11 % ($p<0,001$) du fait de leur

importante perte de volume, donc du collapsus des fibres et de la perte de la porosité qui en découlent.

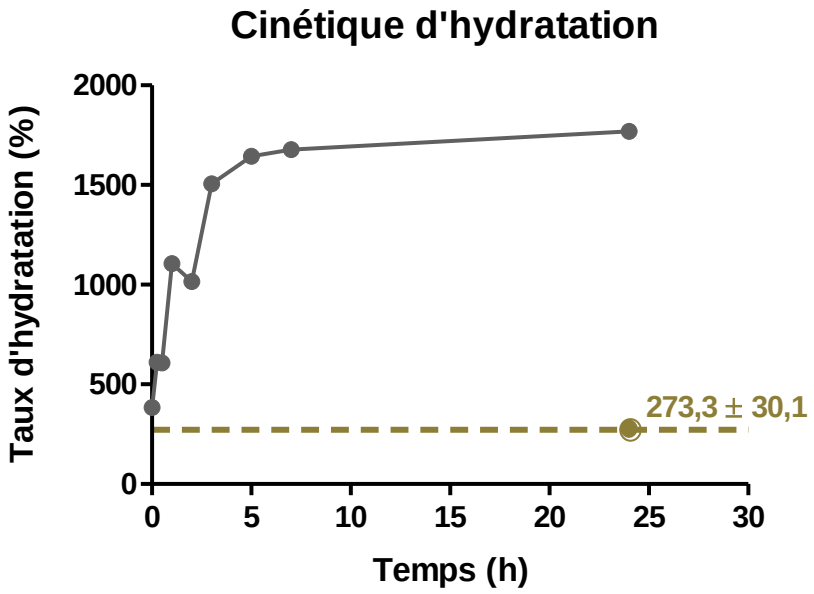

Figure 41 : Cinétique d'hydratation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire lors de son trempage dans 20mL d'eau distillée. La ligne en pointillés indique la valeur maximale de réhydratation des témoins séchés par évaporation (n=8).

4. Résistance mécanique : essais de compression

Comme attendu, les mousses sèches s'avèrent plus facilement manipulables que les hydrogels étant donné leurs propriétés mécaniques globales qui sont supérieures à ces derniers (Tableau 14). En effet, les matériaux séchés présentent une résistance à la compression plus de 200 fois supérieure ($p<0,001$) et un module de compression 10 fois supérieur ($p=<0,001$) à ceux des gels. Les profils de déformation en compression du matériau indiquent une plus grande capacité à se déformer sous la contrainte sans se rompre par rapport aux hydrogels très fragiles.

La résistance à la compression, bien que difficile à mesurer, des mousses réhydratées par trempage durant 24 h dans de l'eau distillée se rapproche de celle des gels de départ.

Tableau 14 : Résistance mécanique des mousses de lysat plaquettaire en compression par rapport aux hydrogels de lysat plaquettaire. Les résultats sont présentés sous la forme Moyenne ± Ecart type. La comparaison entre les mousses et les hydrogels a été réalisée à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney Wilcoxon.

	Résistance à la compression (MPa)	**Module de compression**
Mousses sèches (n=16)	0,15 ± 0,05	0,003 ± 0,001
Hydrogels (n=13)	0,0007 ± 0,0002	0,0003 ± 0,0007
Mousses réhydratées (n=6)	0,001 ± 0,0004	0,0001 ± 0,00004
p mousses vs. gels	<0,001	<0,001
p mousses vs. réhydratées	0,004	0,0003
p gels vs. réhydratées	0,06	0,015

Les profils en compression des trois matériaux (mousses sèches, hydrogels et mousses réhydratées) sont différents. Les mousses sont plus résistantes et présentent une rigidité plus importante du fait de leur module de compression plus élevé que les gels et mousses réhydratées. Celles-ci s'avèrent être les moins rigides.

5. CO_2 supercritique et stérilisation

Le procédé de séchage a démontré, sur six échantillons, sa capacité à stériliser (selon la norme NF EN ISO 11737-2 :2010). Cela signifie que l'utilisation de CO_2 supercritique à de faibles pressions et de températures (90 bar et 42 °C) pourrait être considéré comme un procédé stérilisant et ce, sans adjonction dans l'appareil d'agents antimicrobiens et/ou antibactériens (tels que les dérivés oxygénés).

Deux pools d'échantillons traités dans le cadre de notre travail ont présenté une contamination identifiée comme Bacilles à Gram+ du type *Bacillus species* et un pool a présenté une

contamination par Coques à Gram + en tétrade. Ces Bacilles sont des organismes non pathogènes particulièrement retrouvés dans les sols et utilisés dans des procédés de fermentation [17] et ces Coques sur la peau humaine [18], ce qui soulève l'importance des précautions à prendre dans la manipulation des échantillons par l'opérateur.

Ces résultats soulignent la nécessité de manipuler les échantillons avec une grande rigueur pour conserver leur stérilité à la sortie du sécheur.

6. Suivi de la dégradation en milieu aqueux

Spectrométrie ultraviolet-visible (UV)

La dégradation de la mousse sèche de lysat plaquettaire est suivie grâce à la libération de protéines dans la solution de trempage au cours du temps. La cinétique de dégradation présentée sur la figure 42 met en évidence une dégradation plus lente pour la mousse comparée à celle obtenue pour le gel. Ainsi, au 5ème jour, le gel présente un taux de dégradation 10 fois supérieur à celui observé pour la mousse.

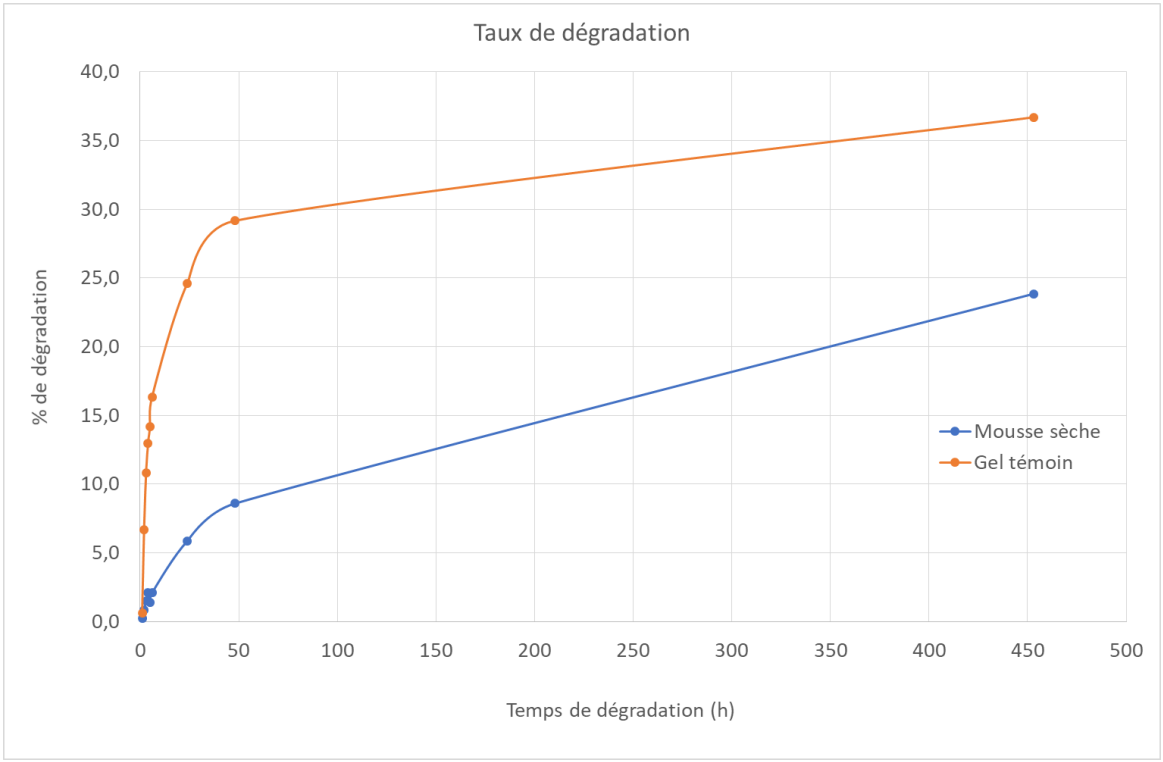

Figure 42 : Suivi de la dégradation d'une mousse sèche et d'un hydrogel de lysat plaquettaire au cours du temps par dosage de l'intensité du pic d'absorbance à 280 nm (longueur d'ondes caractéristique de protéines du lysat plaquettaire) au spectromètre UV.

7. Propriétés biologiques : bioactivité et biocompatibilité

Cinétique de libération des facteurs de croissance en milieu aqueux

Les études de libération menées sur le gel polymérisé et les mousses sèches de lysat permettent de mettre en évidence l'impact de la forme galénique sur les profils de libération du VEGF (Figure 43). Le VEGF sert ici de marqueur de libération des facteurs de croissance. Ainsi, quelle que soit la forme galénique, aucun temps de latence n'est enregistré et la libération du VEGF débute immédiatement après la mise en contact du matériau avec le milieu aqueux. En revanche, les vitesses de libération et donc la durée d'activité thérapeutique dépendent considérablement de la forme galénique du matériau. En effet, les vitesses de libération peuvent être classées de manière décroissance de la manière suivante :

$$V_{\text{lysat liquide}} > V_{\text{hydrogel de lysat}} > V_{\text{mousse de lysat}}$$

Afin de comparer les profils de libération, les valeurs des temps nécessaires pour libérer 50%, 75% et 100% du VEGF contenu dans les matériaux sont présentées dans le tableau 15.

Ces valeurs mettent en évidence des différences significatives puisque :

- le lysat liquide libère quasi-instantanément la totalité du VEGF qu'il contient (et c'est d'ailleurs la raison pour laquelle son efficacité en clinique est limitée et mérite d'être améliorée) ;
- l'hydrogel libère dès les trois premières heures 50% du VEGF et la quasi-totalité est libérée au bout de 3 jours ;
- la mousse de lysat met 24 heures à libérer la moitié du VEGF qu'elle contient et une libération prolongée est observée au-delà du 14ème jour.

Ces résultats démontrent la capacité des hydrogels à obtenir une action rapide mais fugace liée à l'épuisement rapide de la structure gélifiée en facteurs de croissance au cours du temps en comparaison avec les mousses sèches qui sont capables d'obtenir une action rapide dès les premiers instants de leur utilisation puis une action prolongée liée à leur capacité à libérer lentement les facteurs de croissance au cours du temps.

Un dosage comparatif du contenu en VEGF dans une mousse sèche (362,67pg/mL) et dans le lot de LP ayant servi à la constituer (358,43 ± 69,59pg/mL, dosage en duplicat) montre que la totalité du VEGF est libérée au cours du temps.

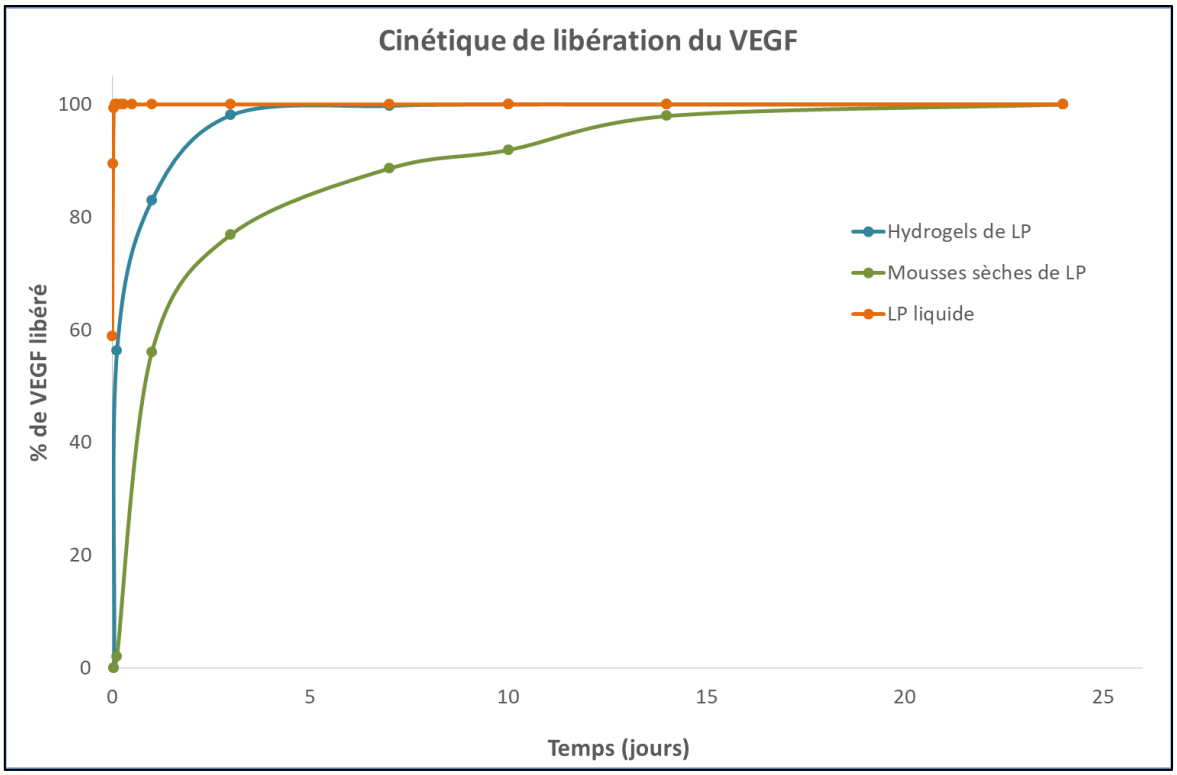

Figure 43 : Cinétique de libération du VEGF dans le milieu au cours du temps par des mousses sèches (en vert, n=8), des hydrogels de lysat plaquettaire (en bleu, n=4) et du lysat plaquettaire liquide en guise de contrôle (en orange, n=2).

Tableau 15 : Temps de libération du VEGF déterminés à partir des courbes pour les mousses sèches, les hydrogels de lysat plaquettaire et le lysat liquide. T50% indique le temps de libération de 50% de la quantité maximale.

	Lysat plaquettaire liquide	**Hydrogels de lysat plaquettaire**	**Mousses sèches de LP**
T50%	Libération quasi-immédiate	3h	24h
T75%		12h	2,5 jours
T100%		4 jours	20 jours

Biocompatibilité du matériau

Les mousses de lysat plaquettaire sont compatibles avec la prolifération des BM-CSM comme en témoignent les marquages LIVE&DEAD (Figure 44). Les cellules ont proliféré sur les mousses, démontrant leur capacité à servir de matrice extracellulaire tridimensionnelle favorable à l'expansion cellulaire. Les observations en microscopie confocale montrent la

forte présence de cellules dans le réseau de fibres (cellules marquées en vert) et la très faible proportion de cellules mortes (cellules marquées en rouge).

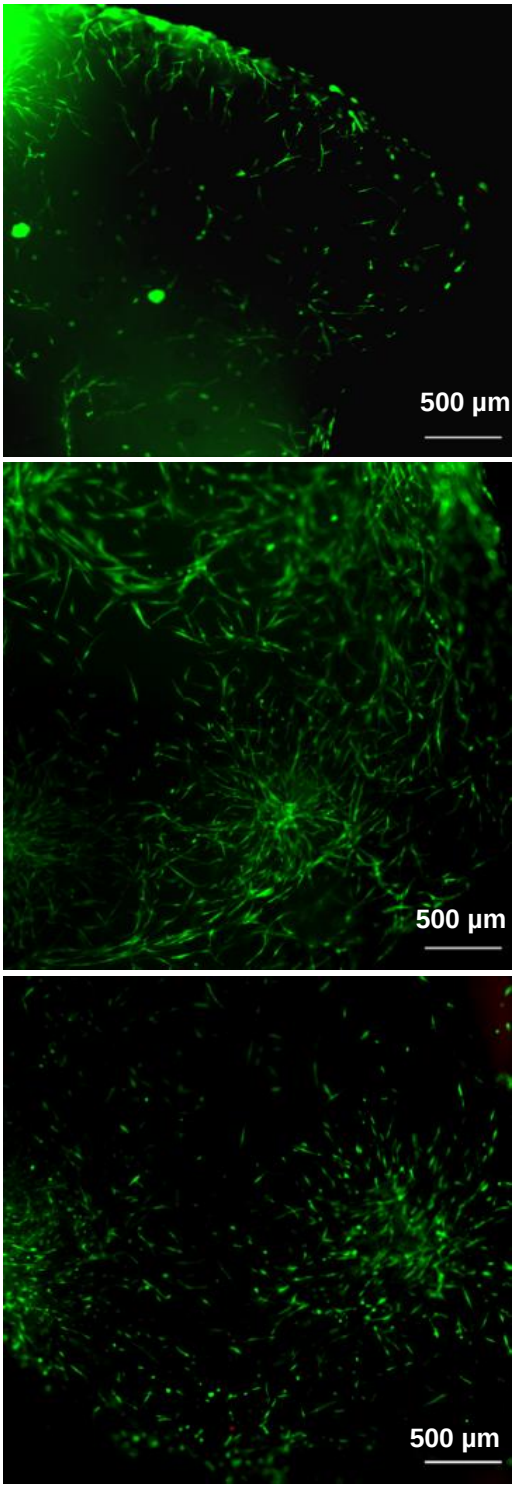

Figure 44 : Observations en microscopie optique avec marquage LIVE&DEAD de BM-CSM mises en culture sur les mousses de lysat plaquettaire en plaques de 24 puits. Les temps d'observation correspondent de haut en bas aux jours 3, 7 et 17.

Une quantification de la prolifération cellulaire par ALAMAR BLUE devait être entreprise par le laboratoire ayant réalisé les premières cultures de BM-CSM mais les expérimentations n'ont pas pu être réalisées en raison de l'épidémie de Covid-19 et ne peuvent donc pas être présentées ici.

En parallèle, de la même façon, des expérimentations prévues sur cellules endothéliales n'ont pas pu être réalisées. L'objectif était d'ensemencer, sur des plaques différentes de celles des cultures de BM-CSM, 200 000 cellules endothéliales dérivées de cordons ombilicaux humains (HUVEC). Leur adhésion aux mousses sur la première nuit devait se faire en présence de 600µL d'un milieu spécifique aux cellules endothéliales (Vascular cell basal medium) enrichi en VEGF (Endothelial cell growth kit-VEGF). Selon le même mode opératoire que pour les BM-CSM, 1mL de milieu devait être rajouté une fois l'adhésion terminée puis la culture était censée se poursuivre sur 21 jours avec changement des milieux tous les 3 jours. Des plaques sans mousses avaient été prévues en guise de contrôle. La viabilité et la prolifération des cellules auraient été observées comme pour les cellules stromales mésenchymateuses en microscopie à l'aide de tests LIVE&DEAD et quantifiés par ALAMAR BLUE.

Implantations in vivo

Les analyses histologiques montrent la réussite de l'implantation sous-cutanée des greffons chez la souris, avec absence de réaction immunitaire disproportionnée (Figures 45 à 47). A 15 jours, un important niveau d'inflammation est encore retrouvé autour des biomatériaux, quel que soit le type d'échantillon observé. Le biomatériau séché par CO_2 supercritique apparaît davantage colonisé par les cellules (Figure 45) que celui séché par évaporation sous hotte à flux laminaire (Figure 47). La coloration à l'hémalun-éosine permet de mettre en évidence la présence de néo-vaisseaux dans les deux structures (Figure 46).

Les animaux greffés n'avaient pas montré de signes cliniques indiquant une souffrance suite à l'implantation.

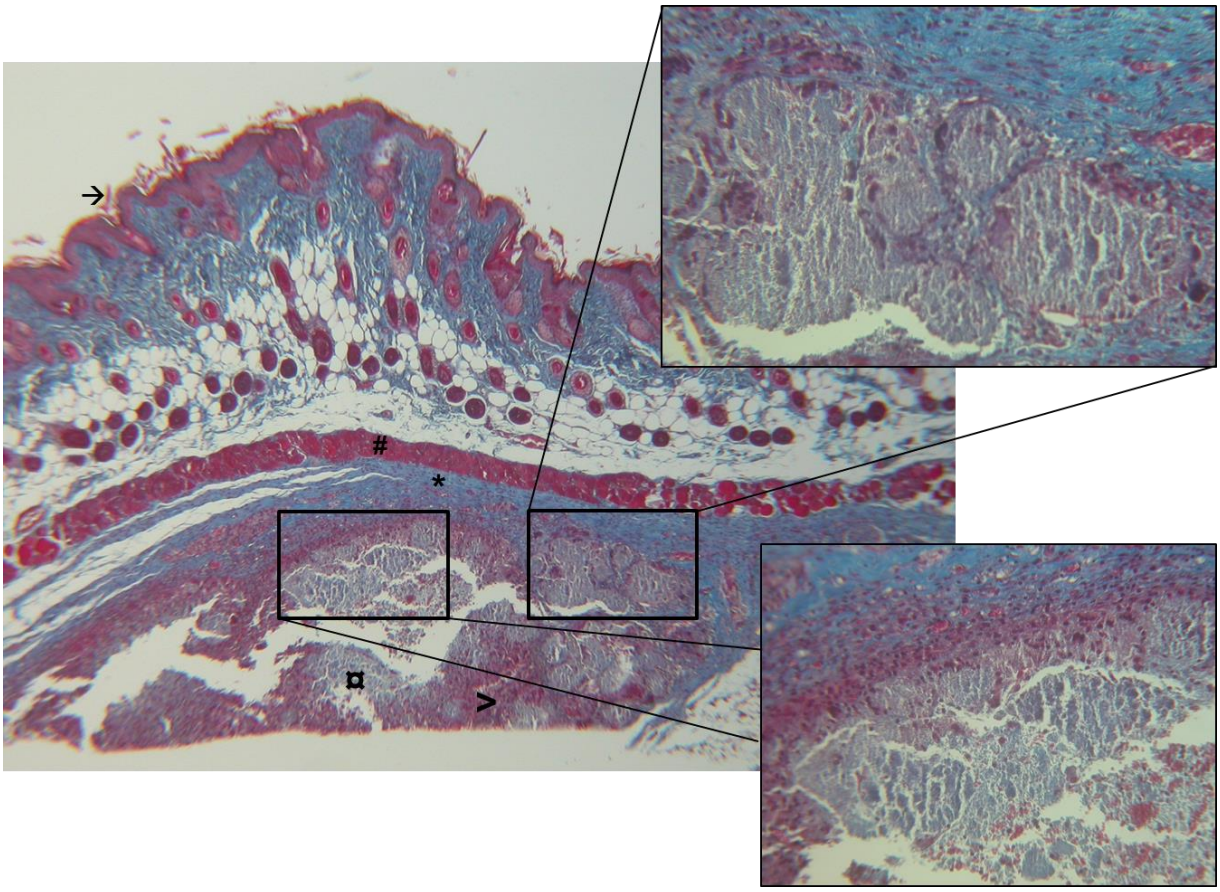

Figure 45 : Coupes histologiques colorées au Trichrome de Masson des mousses sèches de lysat plaquettaire implantées en sous-cutané chez la souris (temps = 15 jours). (→) indique la surface externe de la peau, (#) le fascia musculaire sous-cutané, (*) la coque fibreuse formée autour du greffon, (¤) les inclusions résiduelles de biomatériau et (>) les cellules de l'inflammation.

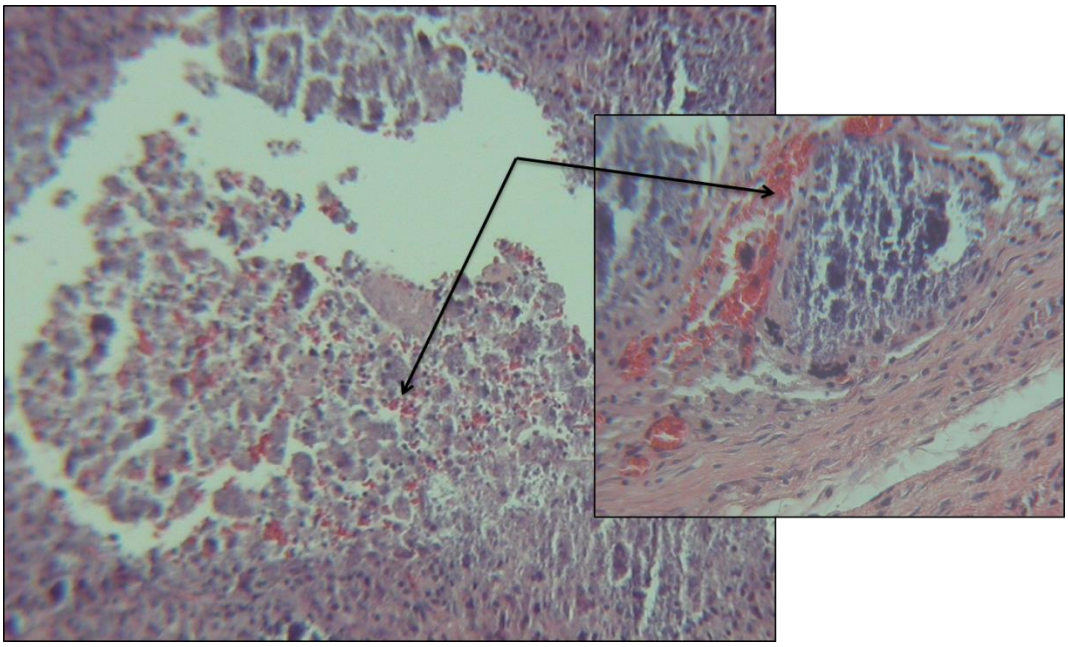

Figure 46 : Coupes histologiques colorées à l'hémalun-éosine des mousses sèches de lysat plaquettaire implantées en sous-cutané chez la souris (temps = 15 jours). Les flèches indiquent les nombreux globules rouges extravasés et les néo-vaisseaux.

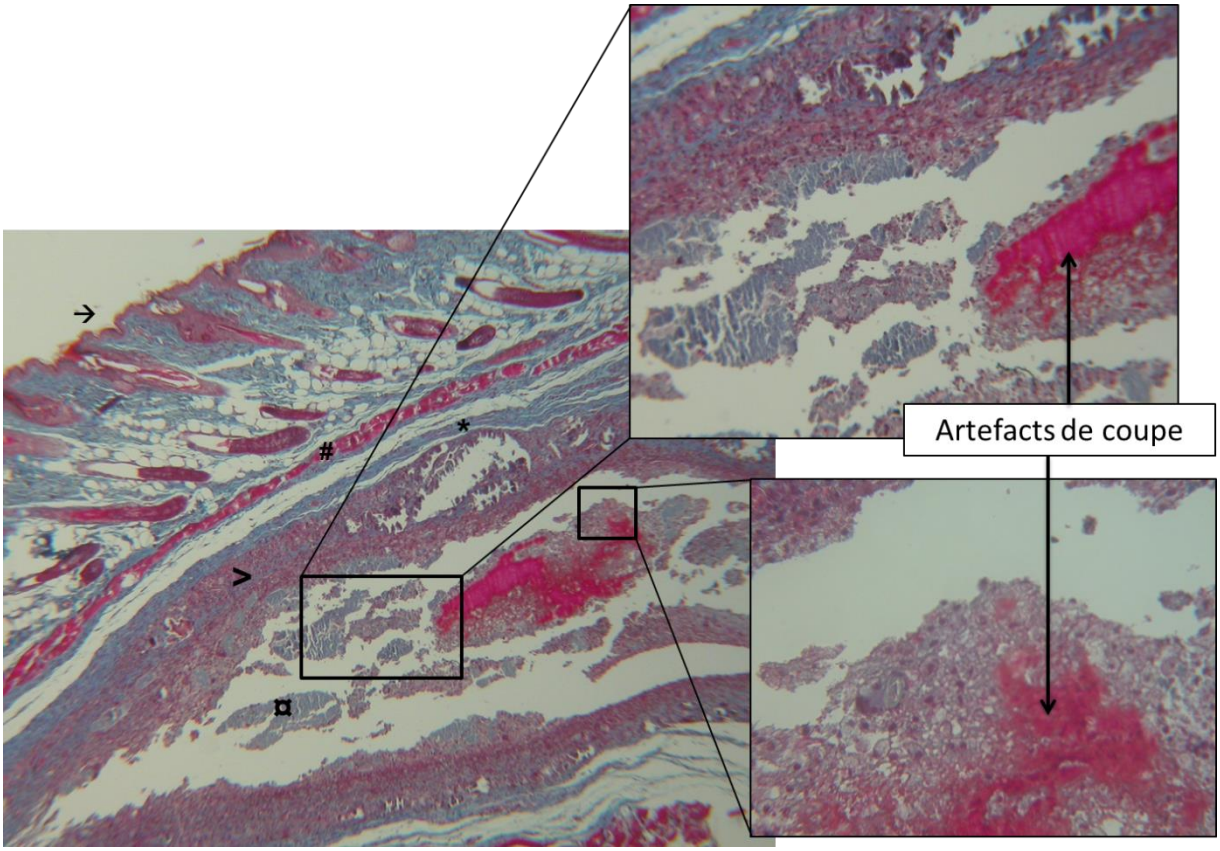

Figure 47 : Coupes histologiques colorées au Trichrome de Masson des biomatériaux laissés à sécher sous hotte à flux laminaire et implantées en sous-cutané chez la souris (temps = 15 jours). (→) indique la surface externe de la peau, (#) le fascia musculaire sous-cutané, (*) la coque fibreuse formée autour du greffon, (¤) les inclusions

résiduelles de biomatériau et (>) les cellules de l'inflammation. Les cellules ont moins colonisé le matériau dont le volume et la porosité étaient réduits du fait de son mode de séchage.

In vivo, le modèle murin nous a donc permis de valider la biocompatibilité des mousses de lysat plaquettaire, malgré l'origine humaine des lysats utilisés. Les souris *nude* utilisées, dépourvues de système immunitaire efficace, présentent une réponse normale aux antigènes indépendants des lymphocytes T [19] mais seulement un vestige de thymus incapable de produire des lymphocytes T matures. Le bon comportement de ces animaux confirme la compatibilité du biomatériau avec la survie animale, d'autant que le degré d'inflammation relevé d'après les analyses histologiques ne diffère pas de celui retrouvé chez des souris témoins greffées en parallèle (données internes au laboratoire StromaLAB) et qu'une néovascularisation est visible à 15 jours sur les sites d'implantation.

Ces résultats servent de préalable indispensable à la conduite de nouvelles implantations. Tout d'abord de nouvelles greffes sous-cutanées sur des temps différents pourront aider à développer la séquence de dégradation du biomatériau par l'organisme au cours du temps.
Ensuite, le choix de modèles de cicatrisation permettra d'étayer la bioactivité de la mousse sèche de lysat plaquettaire riche en facteurs de croissance. La cicatrisation des plaies chroniques au niveau cutané est un modèle largement développé chez l'animal et constitue un champ d'application des lysats plaquettaires comme nous l'avons développé dans la Première Partie. Cela en fait un modèle valable pour étudier l'influence de l'utilisation du biomatériau sur les tissus mous. En ce qui concerne les tissus durs, le modèle de défaut de la calvaria chez le rat est particulièrement indiqué pour observer la capacité du biomatériau à favoriser la régénération osseuse [20]. Il pourrait être envisagé après la modification de la structure du matériau pour le rapprocher de la structure du tissu osseux naturel (incorporation de phosphates de calcium…). Cette fonctionnalisation du biomatériau sera présentée dans la Quatrième Partie.

III. Discussion

Les résultats obtenus démontrent que l'architecture des fibres de fibrine est conservée ainsi que leur agencement tridimensionnel après séchage au CO_2 supercritique. Cela laisse à penser que le trempage en acétone avant les étapes de séchage à proprement parler a permis de substituer complètement la phase aqueuse des hydrogels, puis que le dioxyde de carbone a pu occuper l'ensemble des espaces du matériau initialement remplis par l'acétone. Une telle pénétration du CO_2 au cœur de la structure est prometteuse pour envisager, notamment *via* l'étape de dépressurisation, des modifications de la porosité du matériau final [21]. Le taux de porosité est en effet également reproductible entre les échantillons et s'avère supérieur pour les mousses séchées au CO_2 supercritique par rapport à celles séchées à l'air. La dessiccation entraîne une perte de volume du biomatériau par tassement des fibres, ce qui explique ces différences de porosité [22]. Les modifications que nous pourrons apporter au taux de porosité devront être pensées en évaluant le ratio avantages/inconvénients :

- Augmenter le diamètre des pores du biomatériau serait un bon moyen d'améliorer sa colonisation par les cellules et les vaisseaux sanguins ;
- Cependant cela affecte les propriétés mécaniques de l'ensemble [23] et une telle modification doit être entreprise avec beaucoup de précautions sur des réseaux de fibres, tels que celui de fibrine, qui s'avèrent relativement fragiles. En effet, même si les propriétés mécaniques des mousses obtenues s'avèrent bien supérieures à celles des hydrogels de départ, elles ne seraient pour autant pas comparables à celles de substituts osseux du type céramiques biphasiques de phosphate de calcium (Hydroxyapatite/β-TCP).

En l'état actuel, les mousses de lysat plaquettaire présentent l'avantage de conserver leur contenu protéique après passage dans les différentes solutions de solvant puis contact avec le dioxyde de carbone. Deux phénomènes permettraient d'expliquer le maintien de ces protéines dans le matériau malgré les étapes de trempage :

- D'une part, les facteurs de croissance étant des protéines au même titre que la fibrine, des liaisons pourraient s'établir entre ces différents éléments. Les fibres d'un réseau de fibrine s'assemblent en effet grâce à des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine [24] et l'ensemble du réseau est stabilisé par la formation de liaisons là aussi covalentes entre des éléments Glutamine et Lysine particuliers [25]. Ces réactions sont régies par une transglutaminase plus connue sous le nom de Facteur XIII [24,25]. Ce phénomène de liaison entre les fibres et les autres protéines contenues dans le lysat plaquettaire a été décrit par Fortunato et *al.* comme un « *coating* » des protéines le long des fibres de fibrine, protéines qui sont ensuite libérées dans l'environnement au cours du temps [26].
- D'autre part, la mise au contact du gel imprégné d'acétone avec le CO_2 peut accentuer les phénomènes de collapsus des facteurs de croissance dans le réseau de fibres de fibrine. Ce phénomène est confirmé dans notre cas par l'analogie entre les observations de microscopie électronique publiées par Fortunato et *al.* sur les hydrogels de LP [26] et celles que nous avons obtenues sur nos mousses après séchage. Elles montrent des fibres épaisses et globuleuses après polymérisation du lysat plaquettaire du fait de la présence des protéines sur les fibres (Figure 48). Diaz-Gomez et *al.* ont également déjà évoqué la possibilité pour des protéines d'interagir avec les fibres lors du passage en atmosphère supercritique [27]. Une hypothèse pourrait être soulevée sur le potentiel de ces protéines à créer des liaisons supplémentaires avec le réseau matriciel lors du processus de séchage.

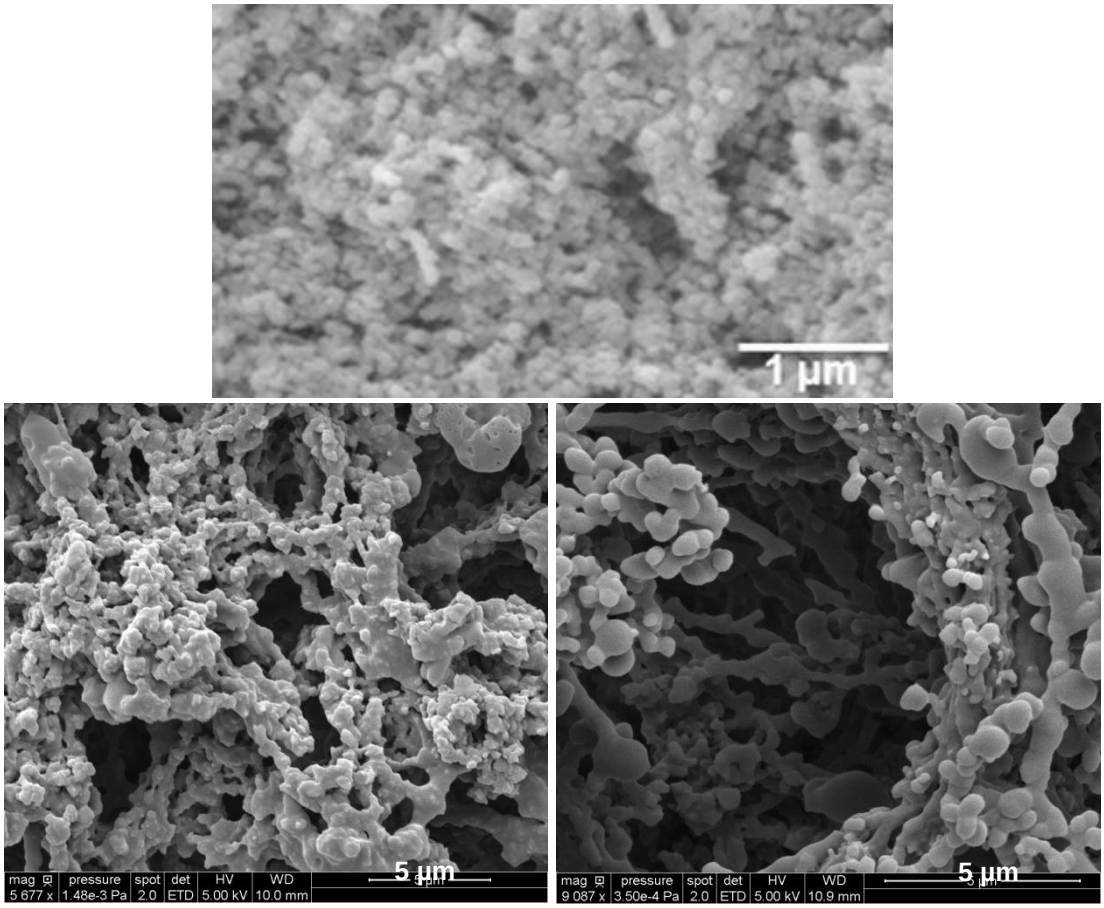

Figure 48 : Observations en Microscopie Electronique à Balayage des réseaux de fibrine et du « *coating* » de protéines sur les fibres. L'image du haut a été reproduite de [26] et correspond à un gel de lysat plaquettaire après polymérisation. Les deux images du bas correspondent à nos mousses sèches de LP (deux échantillons différents).

Quoi qu'il en soit la comparaison de la dégradation du réseau au cours du temps avec le profil de relargage du VEGF illustre bien que les premières protéines sont libérées lorsque le matériau, dépourvu de récipient, est placé dans un milieu aqueux et que ce phénomène de détachement des facteurs de croissance des fibres s'accentue lorsque le matériau est complètement réhydraté. Les mousses de lysat plaquettaire mettent en effet 24 heures à s'hydrater en milieu aqueux puis leur désagrégation commence. Les quantités de VEGF dosées à l'issue de la dégradation du matériau et à l'issue de la dégradation des hydrogels

contrôles sont en outre similaires, ce qui confirme l'absence de perte de matériel protéique au cours des étapes de production du biomatériau.

Ces données permettent de conclure que la mousse sèche de lysat plaquettaire libère des facteurs de croissance de façon prolongée dans le temps en comparaison avec les autres formes galéniques du lysat plaquettaire. Cela constitue un argument clé pour une future utilisation en thérapeutique humaine parce que le dispositif pourra agir durant plusieurs semaines pour favoriser les mécanismes de cicatrisation. Comme il ne sera pas uniquement actif sur ses premières heures d'application, il pourra s'avérer inutile de renouveler son application contrairement au lysat liquide par exemple.

La présence des protéines dans le matériau ayant été confirmée, se posait la question de leur activité. En effet, si tant est que leur présence soit validée d'un point de vue structural, deux éléments pouvaient créer un doute quant à leur potentiel à rester actives :

- leur conformation d'une part qui aurait pu être modifiée lors des multiples étapes du procédé de fabrication, avec pour effet de rendre les protéines incapables de se lier à leurs récepteurs sur les cellules cibles et donc de les rendre inactives,
- et l'origine du LP d'autre part. En effet, le lysat obtenu auprès de sociétés comme Macopharma en France (utilisé ici) ou PL Bioscience en Allemagne est généré à partir de prélèvements sanguins dont la date limite de consommation a expiré. Cependant des études ont déjà montré que ce paramètre ne semblait pas avoir d'influence ne serait-ce que sur la capacité de ces LP à promouvoir la prolifération de CSM en culture [28,29].

Dans la littérature, la bioactivité de facteurs de croissance après incubation dans un sécheur à CO_2 supercritique a déjà été confirmée grâce à la culture de cellules stromales

mésenchymateuses sur des matrices de poly(-ε-)caprolactone enrichies en facteurs de croissance et séchées dans une atmosphère CO_2 supercritique similaire à celle appliquée ici (37°C, 100bars, 30 minutes) [27].

L'activité des facteurs de croissance dans notre biomatériau pourra être étudiée lors de la réalisation des cultures de cellules endothéliales dont nous avons déjà précisé le protocole plus haut. En cas de prolifération de ces cellules et de stimulation de leur activité de néoangiogenèse, le VEGF pourra être considéré comme toujours actif, susceptible d'engendrer une réponse cellulaire. .

Ex vivo, la réalisation de western blots spécifiquement orientés vers le récepteur tyrosine kinase VEGF-R1 [30,31] par exemple permettrait de confirmer la correcte liaison entre le facteur de croissance et son récepteur. Cependant l'absence d'éléments cellulaires dans cette technique limiterait l'observation des cascades de signalisation de ce récepteur et donc l'effet réel de la liaison du VEGF.

D'un point de vue mécanique, Liu et *al.* ainsi que Brown et *al.* ont démontré que les gels à base de fibrine constituaient des gels parmi les plus résistants et déformables puisqu'ils seraient susceptibles de résister à des mises en tension de plus de 300% [32,33]. Leur résistance à la rupture augmenterait d'ailleurs avec la concentration en fibrine dans leur composition [34]. Nos résultats montrent que la résistance initiale des hydrogels est améliorée dans les mousses que nous avons produites. Une augmentation de l'élasticité du réseau de fibres par l'adjonction d'éléments dans sa structure pourra encore être envisagée. Il existe plusieurs protéines naturelles qui pourraient aider à l'amélioration de cette élasticité, comme l'élastine ou le collagène, qui constituent une fois polymérisées de véritables réseaux élastiques. Dans le corps humain, ce sont en effet essentiellement les fibres de collagène, largement développées dans les tissus mous comme dans les tissus durs [35], qui confèrent

une certaine élasticité à la matrice extracellulaire [36]. Leur association à la fibrine contenue dans les mousses pourrait ainsi résoudre le manque d'élasticité du biomatériau.

En 2018, Mendes et *al.* ont montré que l'incorporation de cellulose nanocristalline (CNC) à une matrice de fibrine jouait également un rôle dans la cohésion du réseau. En effet, la CNC est modifiée par adjonction de groupes aldéhydes en surface selon une réaction d'oxydation aux ions periodates et ces groupements servent à créer des liaisons covalentes entre la cellulose nanocristalline d'une part et les protéines du lysat plaquettaire d'autre part [37]. L'ensemble CNC modifiée + lysat plaquettaire constitue un hydrogel lorsque la polymérisation des fibres de fibrine provenant du lysat est enclenchée avec de la thrombine et du calcium. Ce procédé de gélification est même adaptable à une forme d'impression 3D par dépôt de couches successives du mélange à gélifier grâce à des seringues auto-mélangeuses [38].

D'autres procédés de mise en forme adaptés au traitement des polymères pourraient également être employés pour concevoir ces réseaux mixtes. C'est le cas notamment de l'électrofilage (ou « *electrospinning* » en anglais) qui consiste à construire un réseau de polymères, initialement contenus dans une solution, grâce à un courant électrique [39]. Ce procédé a récemment été appliqué à des polymères de fibroïne extraits de cocons de lépidoptères asiatiques (le *Bombyx mori*) pour former une matrice imprégnée par la suite de lysat plaquettaire [40], et également à des polysaccharides de pullulane mêlés à des polymères d'alginate de sodium là encore imprégnés de LP une fois le réseau fibreux constitué [41]

C'est également le cas de la fonctionnalisation par réaction à l'anhydride méthacrylique. Au contact des protéines du lysat plaquettaire, ce composé réagit avec les extrémités OH et NH_2 pour conduire à la formation de groupements méthacrylates et méthacrylamides, rendant la solution photopolymérisable. Les propriétés mécaniques de la matrice obtenue sont améliorées grâce à ce procédé [42].

Pour conclure, la conception du nouveau matériau ouvre de nombreuses perspectives en vue de ses utilisations biomédicales (nous les détaillerons dans la Cinquième Partie) :

- **Ses propriétés lui permettront en effet d'être implanté directement chez les patients pour favoriser ou ré-initier les mécanismes de cicatrisation ;**
- **Dans l'attente de la validation des différentes étapes règlementaires indispensables à son utilisation en médecine (détaillées dans la Cinquième Partie), la structure du biomatériau pourra être rendue disponible pour une utilisation *in vitro* par les laboratoires de recherche afin de servir de matrice de culture pour de multiples lignées cellulaires.**

IV. Références de la Partie 3

[1] Humbert B, Mevellec J-Y, Grausem J, Dossot M, Carteret C. Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge. Tech Ing 2018:32.

[2] Nayak AK, Das B. Introduction to polymeric gels. Polym. Gels, Elsevier; 2018, p. 3–27. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102179-8.00001-6.

[3] Komatsu H, Yoshii K, Okada S. Application of Thermogravimetry to Water-Conten Determinations of Drugs. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1994;42:1631–5. https://doi.org/10.1248/cpb.42.1631.

[4] Santo VE, Duarte ARC, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Hybrid 3D structure of poly(d,l-lactic acid) loaded with chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles to be used as carriers for biomacromolecules in tissue engineering. J Supercrit Fluids 2010;54:320–7. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.05.021.

[5] Hennessy RS, Jana S, Tefft BJ, Helder MR, Young MD, Hennessy RR, et al. Supercritical carbon dioxide-based sterilization of decellularized heart valves. JACC Basic Transl Sci 2017;2:71–84. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.08.009.

[6] Qiu Q-Q, Leamy P, Brittingham J, Pomerleau J, Kabaria N, Connor J. Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009;91:572–8. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31431.

[7] Wehmeyer JL, Natesan S, Christy RJ. Development of a Sterile Amniotic Membrane Tissue Graft Using Supercritical Carbon Dioxide. Tissue Eng Part C Methods 2015;21:649–59. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0304.

[8] Balestrini JL, Liu A, Gard AL, Huie J, Blatt KMS, Schwan J, et al. Sterilization of Lung Matrices by Supercritical Carbon Dioxide. Tissue Eng Part C Methods 2016;22:260–9. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2015.0449.

[9] Scognamiglio F, Blanchy M, Borgogna M, Travan A, Donati I, Bosmans JW a. M, et al. Effects of supercritical carbon dioxide sterilization on polysaccharidic membranes for surgical applications. Carbohydr Polym 2017;173:482–8. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.030.

[10] Baldini T, Caperton K, Hawkins M, McCarty E. Effect of a novel sterilization method on biomechanical properties of soft tissue allografts. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc Off J ESSKA 2016;24:3971–5. https://doi.org/10.1007/s00167-014-3221-0.

[11] Bernhardt A, Wehrl M, Paul B, Hochmuth T, Schumacher M, Schütz K, et al. Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature. PloS One 2015;10:e0129205. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129205.

[12] Bernal S, Alcalá S, Cerecedo D, Ganem-Rondero A. Data on the characterization of a platelet lysate and of the system in which it is included (nanoparticles/hydrogel), intended for the treatment of wounds. Data Brief 2020;30:105529. https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105529.

[13] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971;8:871–4. https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X.

[14] Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. Acta Biochim Biophys Sin 2007;39:549–59. https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.

[15] Babo P, Santo VE, Duarte ARC, Correia C, Costa MHG, Mano JF, et al. Platelet lysate membranes as new autologous templates for tissue engineering applications. Inflamm Regen 2014;34:033–44. https://doi.org/10.2492/inflammregen.34.033.

[16] Katopodes ND. Air-Water Interface. Free-Surf. Flow, Elsevier; 2019, p. 44–121. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815487-8.00002-0.

[17] Dong H, Zhang D. Current development in genetic engineering strategies of Bacillus species. Microb Cell Factories 2014;13:63. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-63.

[18] Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. J Investig Dermatol Symp Proc 2001;6:170–4. https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x.

[19] Pelleitier M, Montplaisir S. The nude mouse: a model of deficient T-cell function. Methods Achiev Exp Pathol 1975;7:149–66.

[20] Brennan MÁ, Renaud A, Amiaud J, Rojewski MT, Schrezenmeier H, Heymann D, et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. Stem Cell Res Ther 2014;5:114. https://doi.org/10.1186/scrt504.

[21] Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. J R Soc Interface 2007;4:999–1030. https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0220.

[22] Tsioptsias C, Paraskevopoulos MK, Christofilos D, Andrieux P, Panayiotou C. Polymeric hydrogels and supercritical fluids: The mechanism of hydrogel foaming. Polymer 2011;52:2819–26. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.04.043.

[23] Le Huec JC, Schaeverbeke T, Clement D, Faber J, Le Rebeller A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. Biomaterials 1995;16:113–8.

[24] Collet J-P, Shuman H, Ledger RE, Lee S, Weisel JW. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:9133–7. https://doi.org/10.1073/pnas.0504120102.

[25] Guthold M, Liu W, Sparks EA, Jawerth LM, Peng L, Falvo M, et al. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. Cell Biochem Biophys 2007;49:165–81. https://doi.org/10.1007/s12013-007-9001-4.

[26] Fortunato TM, Beltrami C, Emanueli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. Sci Rep 2016;6:25326. https://doi.org/10.1038/srep25326.

[27] Diaz-Gomez L, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, García-González CA. Growth factors delivery from hybrid PCL-starch scaffolds processed using supercritical fluid technology. Carbohydr Polym 2016;142:282–92. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.051.

[28] Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. PloS One 2013;8:e68984. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068984.

[29] Jonsdottir-Buch SM, Sigurgrimsdottir H, Lieder R, Sigurjonsson OE. Expired and Pathogen-Inactivated Platelet Concentrates Support Differentiation and Immunomodulation of Mesenchymal Stromal Cells in Culture. Cell Transplant 2015;24:1545–54. https://doi.org/10.3727/096368914X683043.

[30] Roskoski R. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. Biochem Biophys Res Commun 2008;375:287–91. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.121.

[31] Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction - A brief update. Vascul Pharmacol 2016;86:14–7. https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.05.011.

[32] Liu W, Jawerth LM, Sparks EA, Falvo MR, Hantgan RR, Superfine R, et al. Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. Science 2006;313:634. https://doi.org/10.1126/science.1127317.

[33] Brown AEX, Litvinov RI, Discher DE, Purohit PK, Weisel JW. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. Science 2009;325:741–4. https://doi.org/10.1126/science.1172484.

[34] Piechocka IK, Bacabac RG, Potters M, Mackintosh FC, Koenderink GH. Structural hierarchy governs fibrin gel mechanics. Biophys J 2010;98:2281–9. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.040.

[35] Shoulders MD, Raines RT. COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY. Annu Rev Biochem 2009;78:929. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

[36] Jansen KA, Licup AJ, Sharma A, Rens R, MacKintosh FC, Koenderink GH. The Role of Network Architecture in Collagen Mechanics. Biophys J 2018;114:2665–78. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.043.

[37] Mendes BB, Gómez-Florit M, Pires RA, Domingues RMA, Reis RL, Gomes ME. Human-based fibrillar nanocomposite hydrogels as bioinstructive matrices to tune stem cell behavior. Nanoscale 2018;10:17388–401. https://doi.org/10.1039/c8nr04273j.

[38] Mendes BB, Gómez-Florit M, Hamilton AG, Detamore MS, Domingues RMA, Reis RL, et al. Human platelet lysate-based nanocomposite bioink for bioprinting hierarchical fibrillar structures. Biofabrication 2019;12:015012. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab33e8.

[39] Long Y-Z, Yan X, Wang X-X, Zhang J, Yu M. Chapter 2 - Electrospinning: The Setup and Procedure. In: Ding B, Wang X, Yu J, editors. Electrospinning Nanofabrication Appl., William Andrew Publishing; 2019, p. 21–52. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51270-1.00002-9.

[40] Pignatelli C, Perotto G, Nardini M, Cancedda R, Mastrogiacomo M, Athanassiou A. Electrospun silk fibroin fibers for storage and controlled release of human platelet lysate. Acta Biomater 2018;73:365–76. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.025.

[41] Malgarim Cordenonsi L, Faccendini A, Rossi S, Bonferoni MC, Malavasi L, Raffin R, et al. Platelet lysate loaded electrospun scaffolds: Effect of nanofiber types on wound healing. Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV 2019;142:247–57. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.030.

[42] Santos SC, Custódio CA, Mano JF. Photopolymerizable Platelet Lysate Hydrogels for Customizable 3D Cell Culture Platforms. Adv Healthc Mater 2018;7:e1800849. https://doi.org/10.1002/adhm.201800849.

Quatrième partie : Fonctionnalisation des mousses de lysat plaquettaire par incorporation de nouveaux éléments actifs

Il apparaît au vu des résultats présentés précédemment que le lysat plaquettaire, sous forme de gel [1,2] comme de mousse sèche, forme un réseau de fibrine tridimensionnel mimant une matrice extracellulaire dans laquelle les cellules trouvent un environnement favorable à leur survie et leur développement.

Dans l'objectif d'une implantation chez l'Homme, Mano et *al*. décrivent ce type de réseaux de fibres formés à partir de lysat plaquettaire comme des matrices temporaires naturellement destinées à être remplacées par une véritable matrice extracellulaire [3]. En effet, la biocompatibilité du lysat plaquettaire, la capacité du réseau de fibrine à être colonisé par les cellules et son potentiel de dégradation sont autant d'arguments qui permettent d'anticiper sa résorption une fois implanté dans un organisme vivant. Les facteurs de croissance contenus naturellement dans le LP permettront de stimuler les mécanismes cellulaires et tissulaires de l'hôte en vue de permettre la cicatrisation du site greffé. Cependant, les chirurgiens ont besoin de matrices dédiées à la régénération de tissus spécifiques. Dans cet objectif, il est possible d'envisager de fonctionnaliser les mousses sèches de LP et d'apporter des éléments complémentaires susceptibles de favoriser la réparation de certains tissus et d'éventuellement modifier leurs propriétés mécaniques de manière à adapter les propriétés mécaniques au tissu hôte. C'est ce que nous proposons de faire dans le présent chapitre.

I. Enrichissement de la structure en éléments actifs

1. Précipitation de cristaux de phosphate de calcium

En se basant sur le principe du biomimétisme, c'est-à-dire la « démarche […] qui consiste à transférer et à adapter à l'espèce humaine les solutions déjà élaborées par la nature » [4], nous avons souhaité introduire dans le réseau fibreux des nanocristaux de phosphates de calcium

analogues au minéral osseux. L'objectif était de fonctionnaliser les mousses fibreuses similaires à la matrice extracellulaire avec des nanocristaux similaires à la matrice minérale osseuse de manière à optimiser leur utilisation pour la régénération osseuse.

a. Précipitation par trempage dans une solution de Na_2HPO_4

Du fait de la composition des gels contenant des ions Ca^{2+}, nous avons dans un premier temps voulu induire la précipitation des nanocristaux en faisant réagir les ions Ca^{2+} libres (ceux qui n'ont pas réagi avec les facteurs de la coagulation présents dans le lysat plaquettaire pour induire la formation du réseau de fibrine) avec des ions phosphates contenus dans une solution de trempage à base de Na_2HPO_4. La diffusion de la solution de phosphate à l'intérieur du réseau de fibrine gélifié devrait induire une réaction entre les ions PO_4^{3-} et HPO_4^{2-} de la solution de trempage et les ions Ca^{2+} libres du gel [5,6]. Pour assurer une réaction totale des ions Ca^{2+}, la concentration de la solution de Na_2HPO_4 est choisie en excès.
Après polymérisation des gels, 8 mL de gel sont placés dans 250 mL d'une solution à 1,02 $mmol.L^{-1}$ de Na_2HPO_4 durant 24 heures et à température ambiante.

Les étapes suivantes du procédé de fabrication des mousses n'ont pas été modifiées après les 24 heures passées dans la solution de Na_2HPO_4. De façon succincte, les échantillons ont ensuite été trempés 48h dans l'acétone avant d'être placés dans l'enceinte du sécheur à CO_2 pour y être incubés en présence de dioxyde de carbone liquide dans un premier temps puis supercritique à la fin du procédé.
Une fois le séchage terminé, les échantillons ont été analysés par le même procédé d'analyse dispersive en énergie que celui décrit dans la Troisième Partie. Les résultats obtenus sur trois

échantillons différents montrent l'absence d'incorporation de phosphate dans le réseau de fibres (Figure 49). L'observation concomitante du réseau de fibres en microscopie électronique à balayage sans métallisation montre la présence exclusive de cristaux de NaCl (Figure 50).

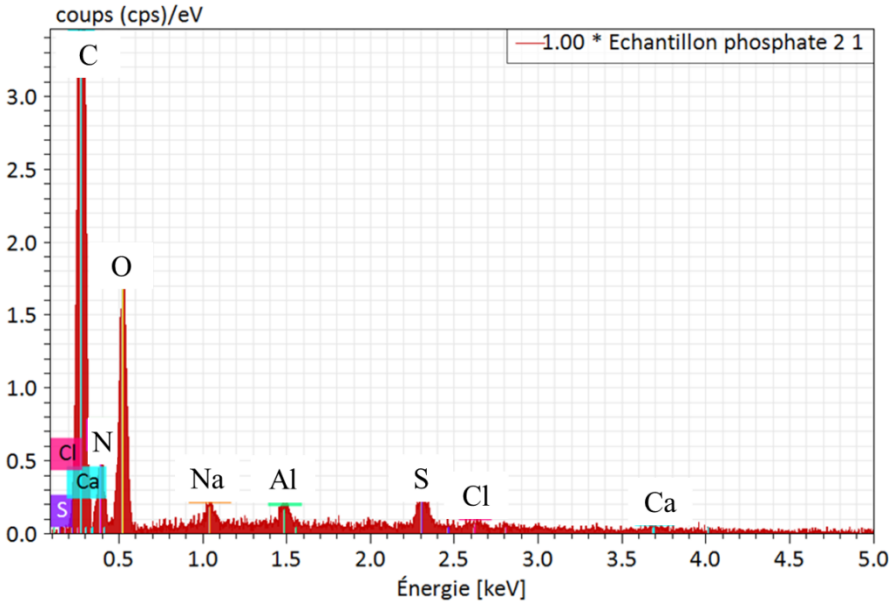

Figure 49 : Analyse dispersive en énergie réalisée sur une mousse sèche de lysat plaquettaire dont l'hydrogel initial avait été trempé dans une solution riche en Na_2HPO_4. L'appareil (Bruker X Flash 613) n'a pas mis en évidence la présence d'ions phosphate dans les matériaux.

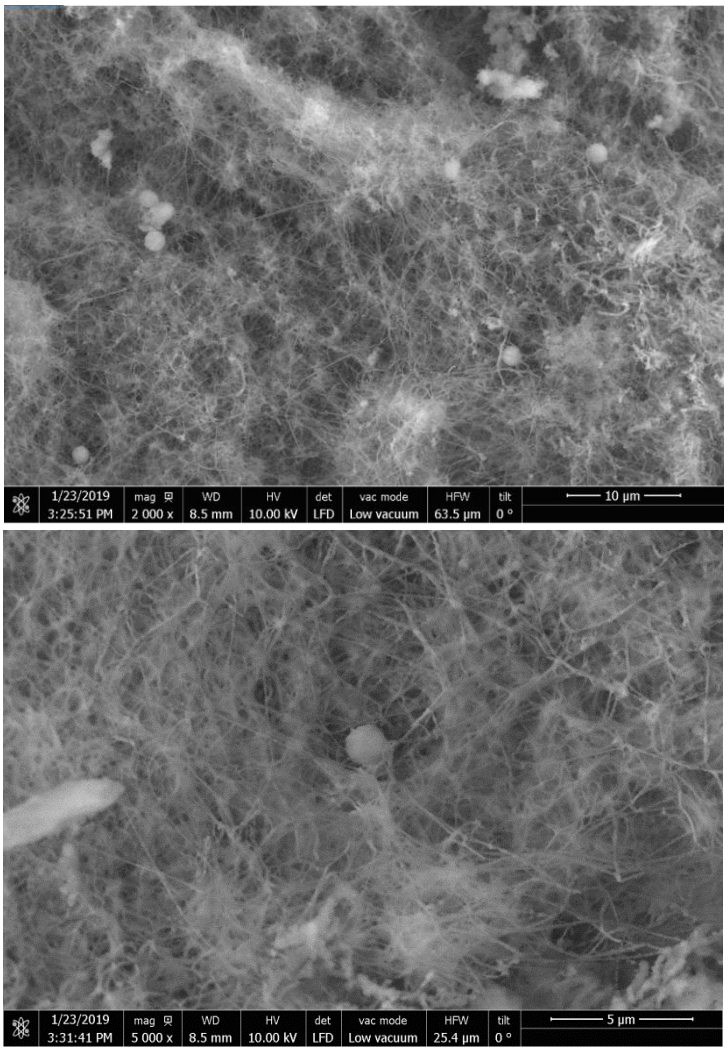

Figure 50 : Observations au microscope électronique à balayage sans métallisation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire dont l'hydrogel avait été trempé au préalable dans une solution de Na_2HPO_4 (grossissements x2000 (en haut) et x5000 (en bas)). Les cristaux visibles sur les acquisitions sont des cristaux de NaCl.

L'absence de cristaux de phosphate de calcium à la surface ou au sein de la structure poreuse du gel après trempage de ce dernier dans la solution de Na_2HPO_4 pourrait être expliquée par le fait que les ions Ca^{2+} susceptibles de réagir avec les ions HPO_4^{2-} et/ou PO_4^{3-} de la solution de trempage ne sont plus disponibles car ils sont mobilisés par les facteurs de coagulation du lysat plaquettaire pour induire la polymérisation de ce dernier.

b. Précipitation par incorporation directe de Na_2HPO_4

Protocole de la précipitation des cristaux

La précipitation par trempage n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, nous avons dans un second temps décidé d'incorporer le phosphate disodique parmi les constituants du gel initial avant sa polymérisation, de manière à induire la précipitation instantanée de phosphate de calcium au cœur du réseau de fibres en formation et avec les ions Ca^{2+} encore disponibles. La quantité d'ions phosphates introduits dans la composition du gel est choisie en excès par rapport à la quantité qui correspondrait à la précipitation d'hydroxyapatite (Ca/P=1,667) de manière à favoriser la réaction de la totalité des ions calcium. Ainsi la quantité de Na_2HPO_4 introduit dans le gel est choisie de manière à respecter un rapport Ca/P=1,16 correspondant à 1,1 mg de Na_2HPO_4 par mg de $CaCl_2$ (soit 0,86 mol de Na_2HPO_4 par mol de $CaCl_2$).

Sachant qu'un mL de gel contient $2{,}5.10^{-8}$ g de $Cacl_2$, $2{,}75\ 10^{-8}$ g de Na_2HPO_4 par mL de gel sont ajoutés sous forme de poudre dans la composition initiale et énergiquement mélangés de manière à dissoudre le plus rapidement possible la poudre dans le milieu encore liquide.

Les hydrogels n'ayant pas polymérisé après 4h, ils ont été laissés à température ambiante et nous avons observé une polymérisation à 12h après leur constitution. Le retard de polymérisation observé par rapport au temps obtenu avec le gel de référence (sans Na_2HPO_4) s'explique par :

- La moindre disponibilité du calcium pour initier et amplifier le processus de polymérisation ;
- Et la mise en jeu d'autres mécanismes moins rapides impliquant par exemple les pyrophosphates (espèces anioniques constituées de résidus orthophosphates) retrouvés dans les granules plaquettaires. Ces derniers jouent notamment un rôle dans l'activation des facteurs XIII et V de la coagulation [7].

Une fois la polymérisation terminée, le protocole appliqué pour aboutir au séchage du matériau au CO_2 supercritique reste inchangé. Les mêmes analyses que celles précédemment décrites pour les échantillons trempés dans la solution de Na_2HPO_4 ont été réalisées (EDX et observation concomitante au microscope électronique à balayage sans métallisation). Les résultats mettent en évidence la réussite de la réaction de précipitation avec l'apparition claire d'une bande correspondant à la présence de groupements phosphates sur le spectre EDX (Figure 51) et l'apparition de nouveaux cristaux de morphologie irrégulière observés au MEB (Figure 52). De plus, le réseau fibreux semble non affecté par l'introduction de Na_2HPO_4 dans la composition du gel.

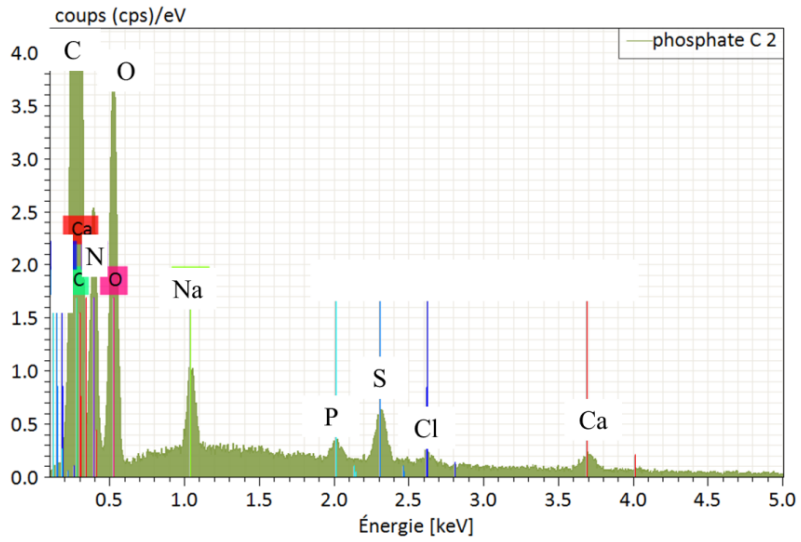

Figure 51 : Analyse dispersive en énergie orientée sur les nouveaux cristaux observés au microscope électronique à balayage sur les échantillons dans lesquels de la poudre de Na_2HPO_4 avait été incorporée. Les bandes du phosphate et du calcium apparaissent clairement.

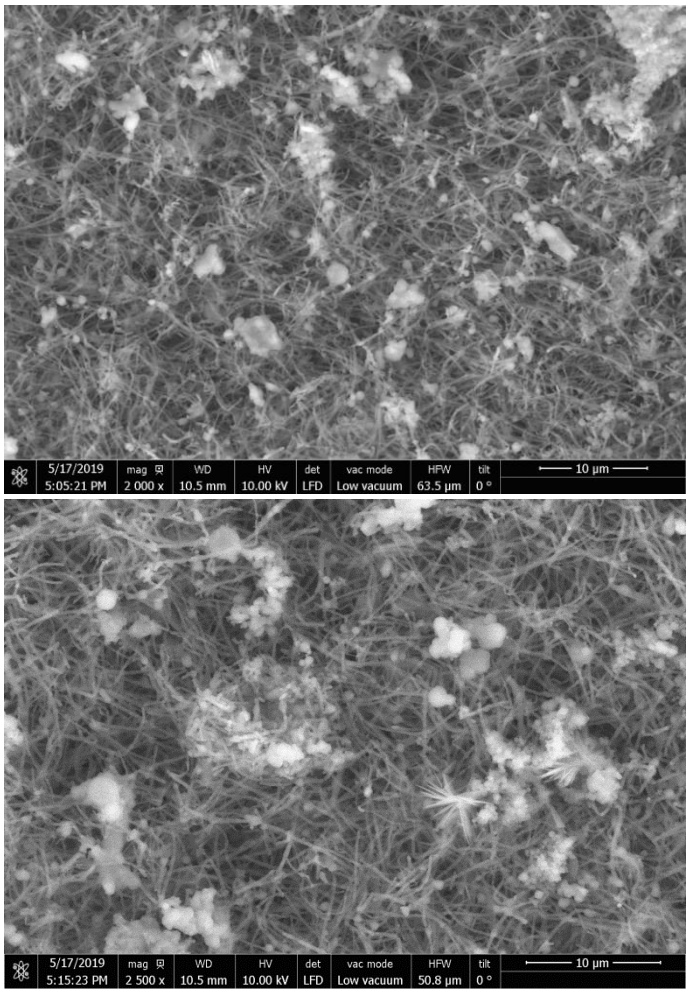

Figure 52 : Observations au microscope électronique à balayage sans métallisation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire dans laquelle une poudre de Na_2HPO_4 avait été incorporée dans la composition du gel avant polymérisation (grossissements x2000 (en haut) et x2500 (en bas)). De nouveaux cristaux à morphologie plus irrégulière et correspondant à des cristaux de phosphate de calcium sont visibles.

Influence sur la porosité des mousses

Les analyses de porosité réalisées sur les mousses qui contiennent des cristaux de phosphate de calcium ne révèlent pas de modification significative du taux de porosité. En effet, les mousses composites chargées de phosphate de calcium présentent une porosité de 85,01% contre une porosité de 83,42 ± 4,85% pour les mousses de référence. En revanche, la répartition de la taille des pores semble être légèrement modifiée par la présence des cristaux minéraux (Figure 53). Ainsi, on observe une très légère augmentation de la taille des pores notamment de la porosité située à 10 µm de la mousse de référence qui passe à 14 µm pour la

mousse composite. De plus, on observe une diminution du nombre de pores de 2, 7 et 14 µm pour la mousse chargée en particules minérales comparée au nombre observé pour la mousse de référence. Cette diminution peut être expliquée par la précipitation des phases phosphocalciques à l'intérieur de ces porosités.

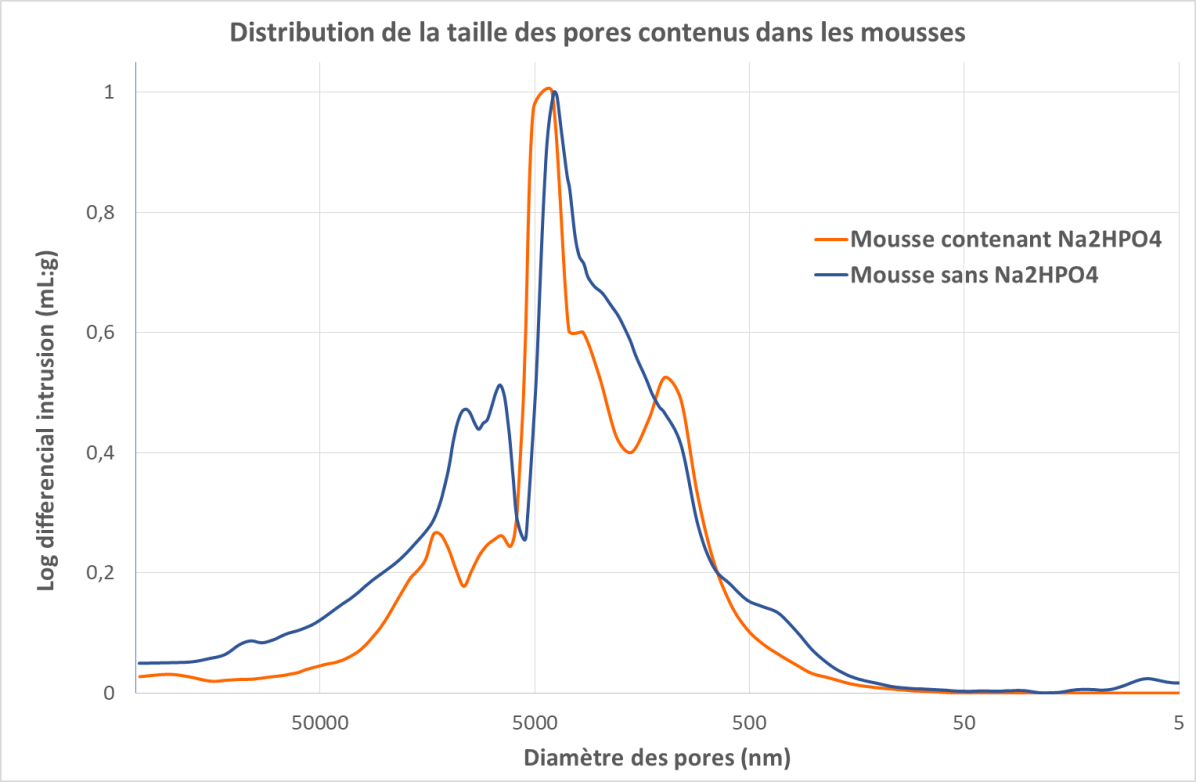

Figure 53 : Diagramme de distribution de la taille des pores contenus dans les mousses de référence (ne contenant pas de Na_2HPO_4) (en bleu) *vs*. les mousse contenant du Na_2HPO_4 (en orange).

Influence sur les propriétés mécaniques

Les nanocristaux minéraux ont été introduits dans la phase organique de la mousse de manière à favoriser l'ostéointégration [8,9] et améliorer leurs propriétés mécaniques.

Nous avons ainsi analysé la résistance à la compression des mousses enrichies en cristaux de phosphate de calcium en appliquant le même protocole que celui décrit dans la Troisième Partie du manuscrit. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative

concernant la résistance à la compression des mousses de lysat plaquettaire (0,15 ± 0,06MPa) par rapport à celles enrichies en phosphate (0,15 ± 0,06 ; p=0,9) (Figure 54), mais leur module de compression est légèrement augmenté en présence de nanocristaux (p=0,003, n=5).

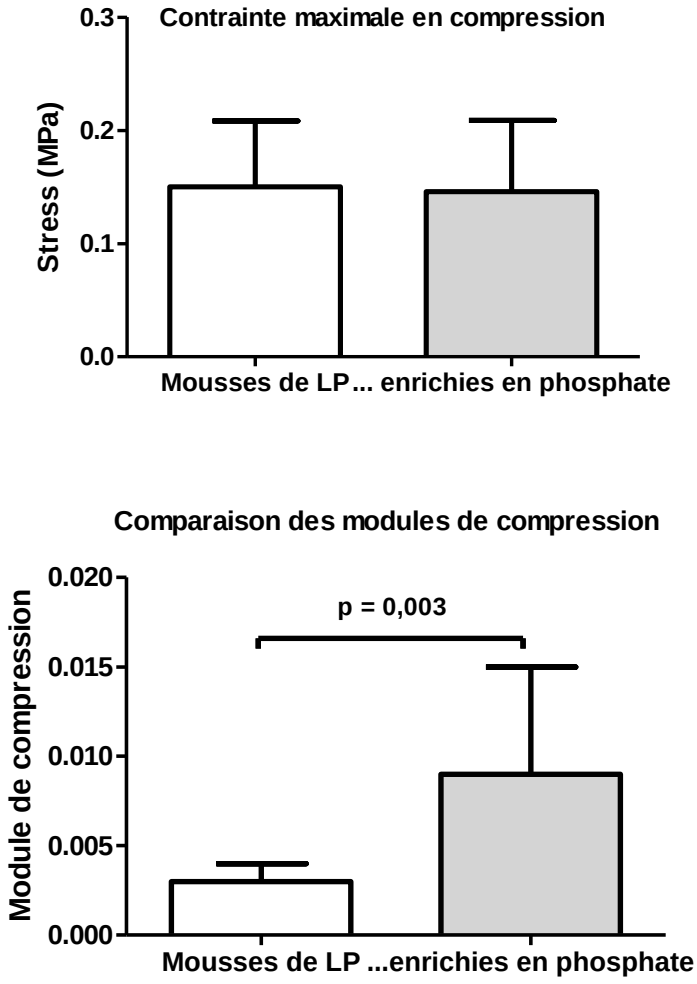

Figure 54 : Evaluation des propriétés mécaniques des mousses sèches de lysat plaquettaire enrichies ou non de phosphate. Le graphe du haut correspond à la comparaison des contraintes maximales appliquées en compression et celui du bas aux modules de compression des deux matériaux.

La présence de cristaux de phosphate de calcium n'entraîne donc pas de modification réelle de la résistance des mousses en compression. La taille des cristaux est trop petite et leur nombre trop clairsemé dans le réseau de fibres pour engendrer une modification conséquente des propriétés mécaniques de la structure.

L'amélioration des propriétés mécaniques de la mousse demandera donc de trouver de nouvelles stratégies que nous développerons plus loin comme l'association du réseau de fibrine à des céramiques phosphocalciques.

Précipitation dans les conditions Ca/P=1,16 en l'absence de NaCl

Afin d'augmenter la quantité de nanocristaux précipités dans la structure fibreuse et d'éliminer la présence de cristaux « parasites » de chlorure de sodium, nous avons souhaité remplacer le NaCl présent dans la composition de départ du gel et dont le rôle est uniquement de maintenir l'osmolarité de l'hydrogel, par du $CaCl_2$. 1 mL de gel contenant $4{,}43.10^{-8}$ moles de NaCl, pour maintenir les quantités de chlore constantes, 24,6 µL de solution de $CaCl_2$ à 10% ont été ajoutés aux 25 µL initiaux, portant le volume de cette solution à 49,6 µL par millilitre de gel soit $4{,}96.10^{-8}$ g ou $4{,}47.10^{-8}$ mol de $CaCl_2$.

$5{,}46.10^{-8}$ g de Na_2HPO_4 sont ensuite ajoutés de manière à respecter comme précédemment le ratio 1,1 mg de Na_2HPO_4 par mg de $CaCl_2$.

Pour maintenir le volume de liquide constant, 261,4 µL d'eau distillée ont été ajoutées lors de la fabrication des gels afin de compenser la quantité d'eau perdue par l'élimination de la solution de NaCl (Tableau 16).

Tableau 16 : Composition des hydrogels (pour 1mL de volume) constitués avec adjonction de poudres de Na_2HPO_4.

Composition des gels contenant du Na2HPO4 et du NaCl	Composition des gels contenant du Na2HPO4 en l'absence de NaCl
• 687 µL de Lysat Plaquettaire • 25 µL de $CaCl_2$ • 286 µL de NaCl, solution enrichie en Na_2HPO_4 • 2µ L d'Acide Tranexamique	• 687 µL de Lysat Plaquettaire • 49,6 µL de $CaCl_2$ • 261,4 µL d'eau distillée riche en Na_2HPO_4 • 2 µL d'Acide Tranexamique

Les hydrogels ont été laissés à température ambiante 12h pour s'assurer de la polymérisation puis le protocole appliqué pour aboutir au séchage du matériau au CO_2 supercritique est resté inchangé. Les mêmes analyses que celles précédemment décrites ont été réalisées (EDX et observation concomitante au microscope électronique à balayage sans métallisation). Les résultats mettent en évidence la réussite de la précipitation de cristaux de phosphate de calcium (Figures 55 et 56).

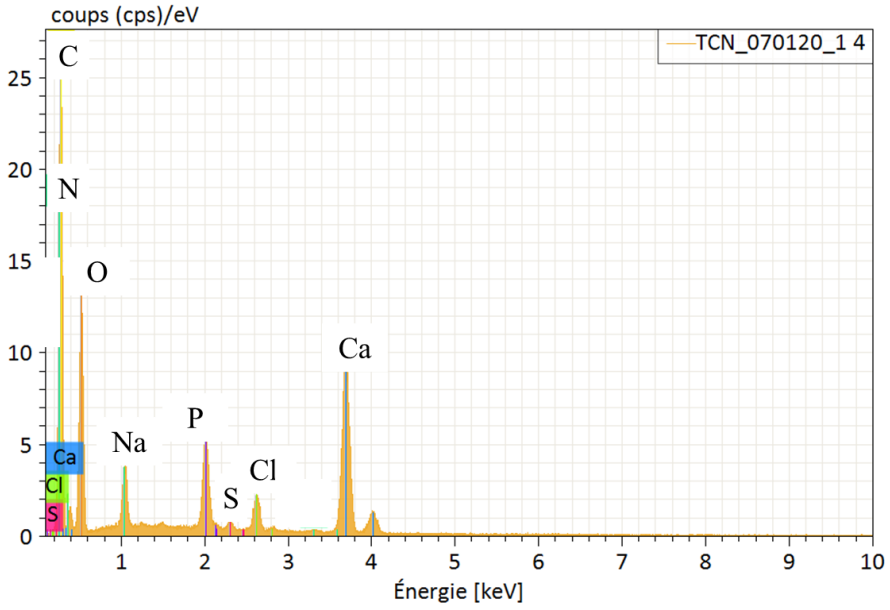

Figure 55 : Analyse dispersive en énergie orientée sur les nouveaux cristaux observés au microscope électronique à balayage sur les échantillons sans solution de NaCl. Les bandes du phosphate et du calcium apparaissent clairement.

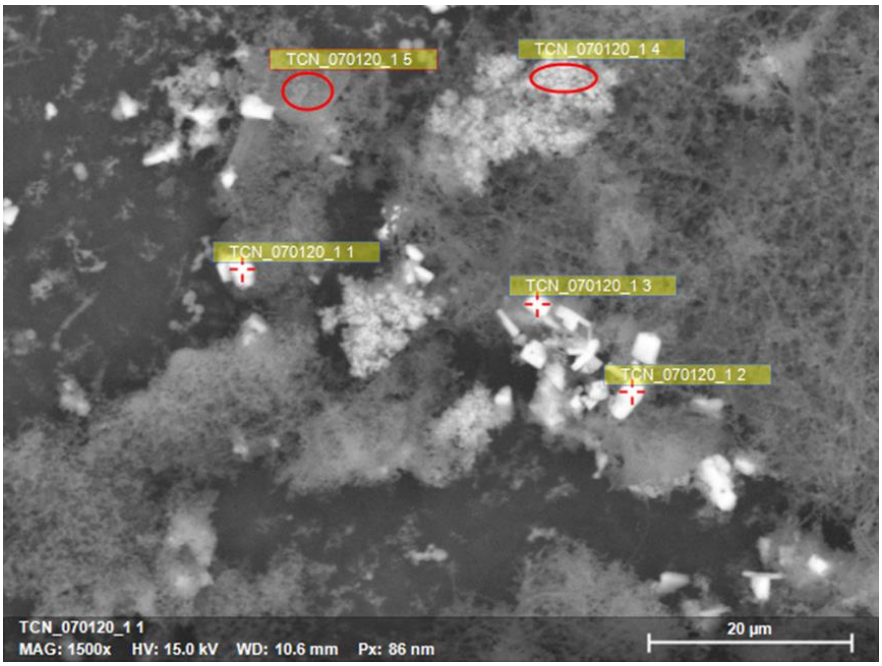

Figure 56 : Observations au microscope électronique à balayage sans métallisation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire constituée sans la solution de NaCl (grossissement x1500).

Caractérisation des cristaux précipités

Après avoir démontré la possibilité d'intégrer des nanocristaux phosphocalciques à l'intérieur du réseau fibreux organique, il convient de caractériser ces derniers de manière à déterminer quelles sont les phases minérales en présence. Pour caractériser précisément les cristaux, il convient de les isoler du réseau fibreux et d'en retirer une quantité suffisante pour réaliser les analyses FTIR et DRX.

Malheureusement, la quantité de nanocristaux précipités dans les gels et présente dans les mousses est insuffisante pour réaliser la caractérisation des cristaux directement sur les matériaux.

Nous avons donc décidé de caractériser les cristaux en réalisant la précipitation en l'absence de lysat plaquettaire et en l'absence ou en présence d'acide tranexamique de manière à évaluer son influence sur la précipitation.

Afin d'amplifier la réaction de précipitation, nous avons choisi de réaliser deux solutions d'eau distillée contenant chacune une des deux espèces $CaCl_2$ et Na_2HPO_4. Les solutions sont préparées de manière à ce que 1,24 g de $CaCl_2$ soient dissous dans 250 mL d'eau distillée constituant ainsi la solution A tandis que la solution B est constituée de 1,36 g de Na_2HPO_4 dissous dans 500 mL d'eau distillée.

La solution A est versée rapidement dans la solution B sous agitation puis le mélange A+B est maintenu sous agitation durant une dizaine de secondes pour assurer l'homogénéisation de la suspension obtenue au cours de la réaction de précipitation (Figure 57). La suspension est ensuite filtrée à l'aide de filtres à 0,45 µm sous pompe à vide puis rincée à 3 reprises avec de l'eau distillée et placée à sécher dans une étuve à 37 °C durant 24 heures. La phase minérale récupérée sera nommée dans la suite du manuscrit « Min-CaP1,16 ».

La même procédure est entreprise en rajoutant 500 µL d'acide tranexamique (AT) à la solution de $CaCl_2$ pour évaluer l'influence de l'AT sur la formation des cristaux. Les particules minérales récupérées seront nommées dans la suite du manuscrit « Min-CaP1,16-AT ».

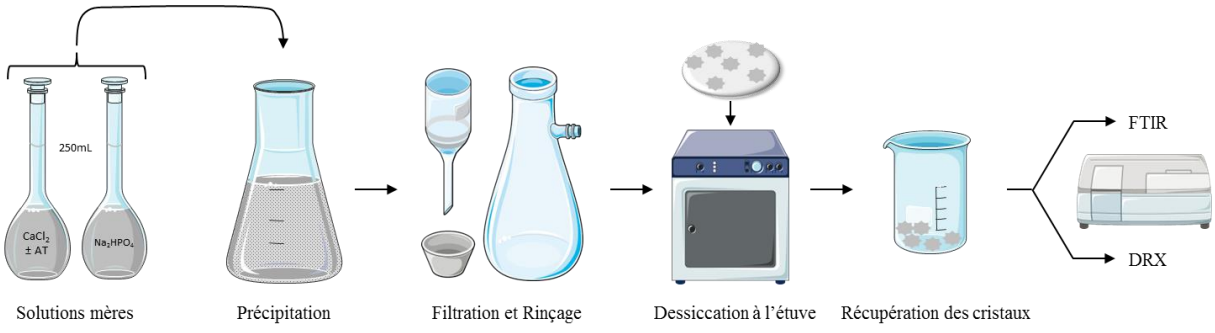

Figure 57 : Précipitation des cristaux de phosphate de calcium en extemporané pour analyser leur composition et leur structure.

Les phases minérales recueillies sont par la suite analysées par FTIR et DRX afin d'en déterminer la nature.

Les spectres FTIR représentés sur la figure 58 réalisés sur les cristaux obtenus en présence ou en l'absence d'acide tranexamique semblent correspondre au spectre d'une apatite mal cristallisée [10]. On observe en effet la présence de ses bandes apatitiques caractéristiques à 1081 et 1030 cm^{-1} (ν_3 PO_4^{3-}), 960 cm^{-1} (ν_1 PO_4^{3-}), 601 et 570 cm^{-1} (ν_4 PO_4^{3-}), 474 cm^{-1} (ν_2 PO_4^{3-}) ainsi que des bandes attribuables aux ions HPO_4^{2-} à 1180, 1250 et 875 cm^{-1} [10].

Les diagrammes DRX représentés sur la figure 59 montrent un recoupement de phases minérales constituées d'hydroxyapatite (fiche JCPDS 09-0432) auxquels s'ajoutent une phase de phosphate octocalcique (OCP) (Fiche JCPDS 00-026-1056) [10]. La présence d'une petite raie à 11.6 ° (2θ) est aussi caractéristique de la présence en très faible quantité de phosphate dicalcique dihydraté (DCPD) (Fiche JCPDS 00-011-0293).

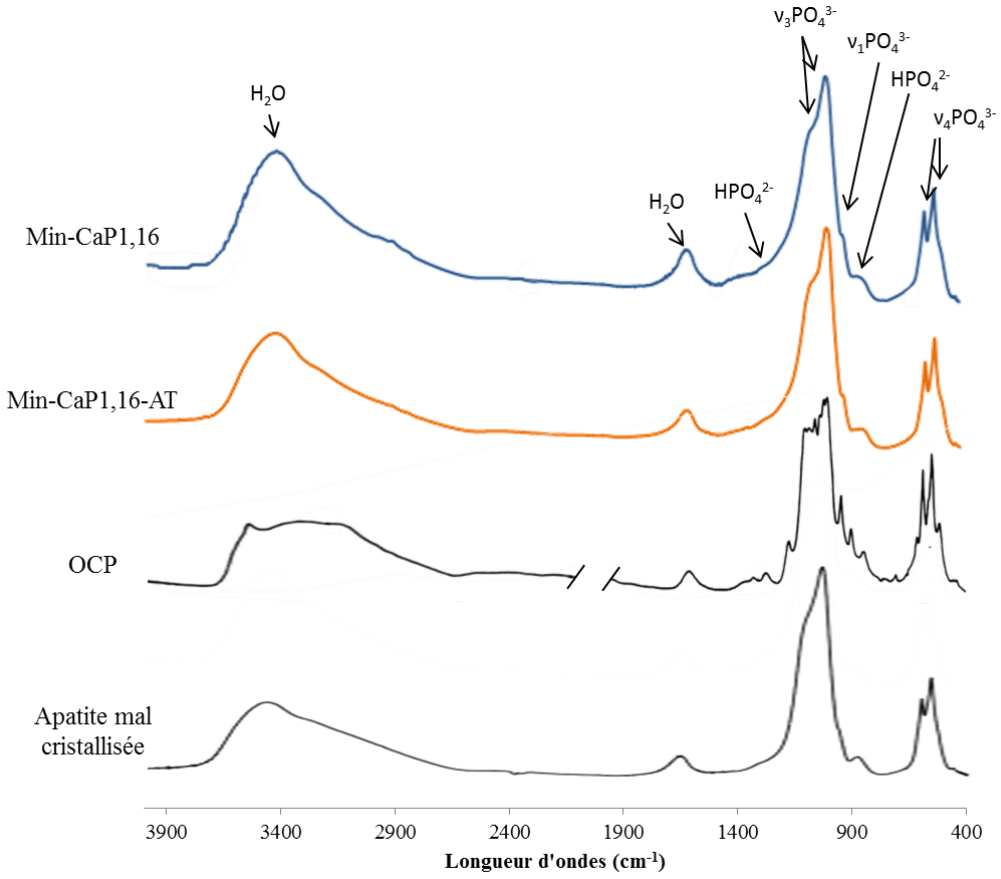

Figure 58 : Analyse FTIR des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ et de Na_2HPO_4 et en présence (courbe orange) ou en l'absence (courbe bleue) d'acide tranexamique. Les courbes de références correspondent en haut à l'OCP [11] et en bas à une apatite mal cristallisée [10].

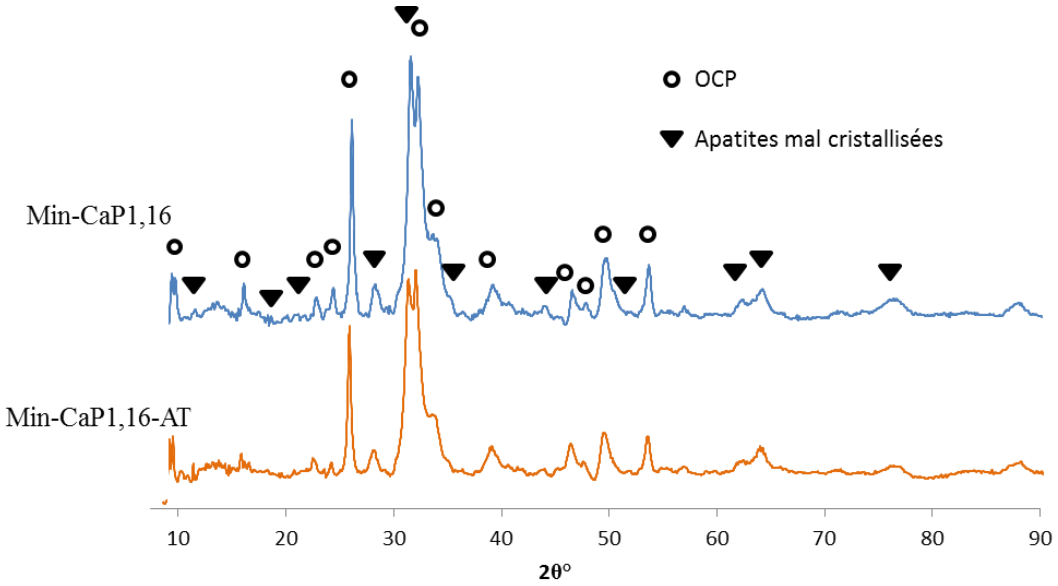

Figure 59 : Analyse DRX des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ et de Na_2HPO_4 et en présence (courbe orange) ou en l'absence (courbe bleue) d'acide tranexamique. Les pics de référence de l'OCP sont indiqués par des cercles (PDF 00-026-1056) et ceux des apatites mal cristallisées par des triangles (PDF 00-0009-0432 et PDF 00-009-0077).

2. Création de biomatériaux composites à base de mousses sèches de lysat plaquettaire

a. Association à des phosphates de calcium pulvérulents

Dans l'objectif d'augmenter la quantité de phase minérale biomimétique à l'intérieur du gel, nous avons ensuite décidé d'incorporer des poudres d'hydroxyapatite directement dans la composition du gel avant sa polymérisation.

La poudre introduite est une poudre d'hydroxyapatite stœchiométrique fournie par la société Teknimed (Toulouse, France). La poudre a été calcinée à 750°C avant d'être finement broyée et tamisée de manière à sélectionner les particules de diamètre compris entre 90 µm et 125 µm correspondant ainsi d'après la définition de la Pharmacopée Européenne à une poudre dite « très fine ».

Dans un premier temps, le mélange habituel des constituants a été réalisé pour obtenir 1 mL de gel et 0,5 g de la poudre précédemment citée a été dispersée à la surface de la solution de manière à ce que sa sédimentation progressive soit freinée par l'augmentation de la viscosité du gel durant la phase de polymérisation (Figure 60-gauche).

Cependant, la vitesse de polymérisation du gel étant plus lente que la vitesse de sédimentation de la poudre, l'intégralité des particules a eu le temps de se déposer au fond du récipient avant que l'hydrogel ne soit constitué.

Dans un second temps, un dispositif rotatif a été conçu et les constituants du matériau composite ont tous été mélangés dans un eppendorf hermétique de 1,5 mL compatible avec le dispositif ; l'objectif étant d'assurer une répartition homogène de la poudre dans la solution finale durant la durée de la prise du gel (Figure 60-droite). Toutefois les mouvements liés à la rotation du récipient ont entrainé la formation d'un caillot fibreux de petit volume au milieu

du tube sans que ni les particules de poudre, ni la phase liquide ne s'y soient spécifiquement liés.

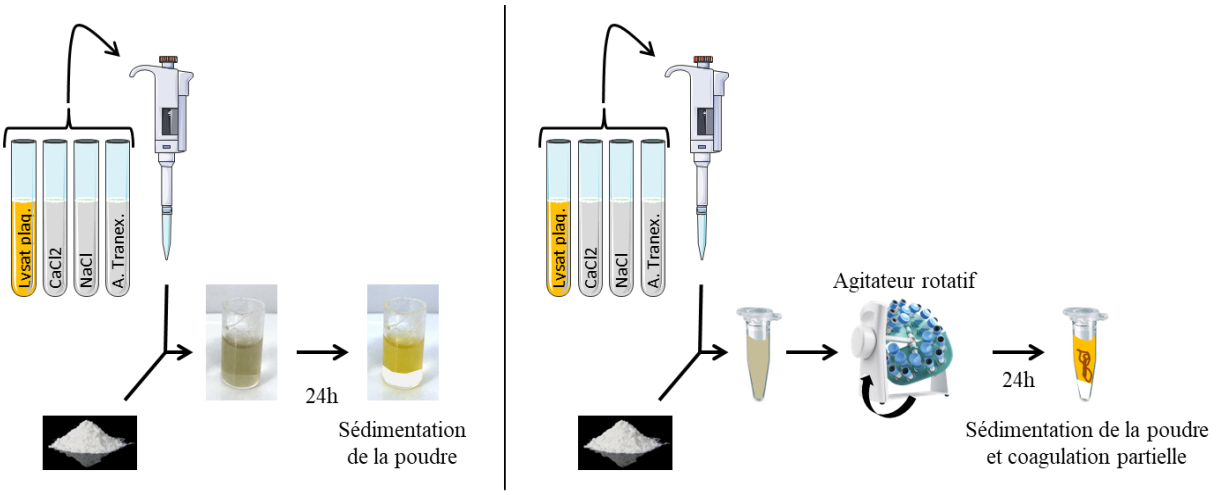

Figure 60 : Procédures mises en œuvre utilisé pour ajouter les poudres de phosphate de calcium aux hydrogels de lysat plaquettaire.

b. Association à des céramiques biphasiques HA/TCP poreuses

Comme nous l'avons vu précédemment, l'introduction de nanocristaux biomimétiques n'a pas permis d'augmenter de manière significative les propriétés mécaniques du composite et l'introduction directe de particules phosphocalciques n'a pas permis d'obtenir des composites homogènes. C'est la raison pour laquelle une alternative proposée est d'élaborer un biomatériau composite rigide en intégrant la mousse à l'intérieur d'un squelette minéral phosphocalcique.

La combinaison d'un réseau de fibrine riche en facteurs de croissance et d'une phase minérale à base de phosphate de calcium constituerait un biomatériau composite bioactif capable de libérer de manière prolongée les facteurs de croissance naturellement contenus dans la mousse

de lysat plaquettaire et capable de présenter des propriétés mécaniques compatibles avec le tissu osseux hôte.

Pour réaliser ce composite, nous avons choisi comme squelette minéral, des céramiques biphasiques constituées de 35% d'hydroxyapatite et 65% de phosphate tricalcique β. Ces céramiques commercialisées par la société Teknimed (Cubes Ceraform®, Teknimed, Toulouse, France) se présentent sous forme de cube poreux de 3mm de côté et présentent environ 28 ± 1% de porosité interconnectée distribuée suivant 3 tailles de pores : 190 µm, 10 µm et 190 nm (Figure 61).

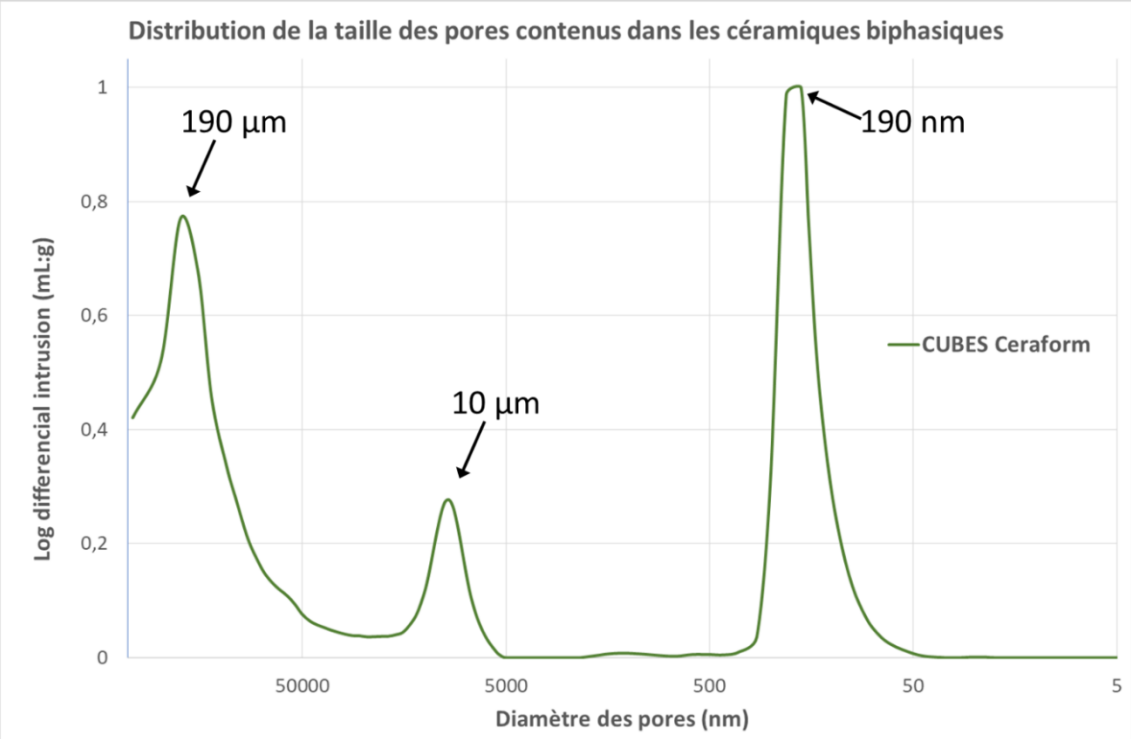

Figure 61 : Représentation graphique de la distribution des pores dans les cubes Ceraform® de céramique biphasique (35%HA et 65% β-TCP).

10 cubes de 3 mm d'arête (correspondant à une masse moyenne de 0,03 ± 0,001 g) ont été déposés dans le récipient en verre puis 1 mL de solution habituelle (lysat plaquettaire + chlorure de calcium + chlorure de sodium + acide tranexamique) préparée extemporanément

ont été ajoutées dans le récipient de manière à recouvrir tous les cubes. L'ensemble a ensuite été placé sous vide pendant 5 min pour favoriser la pénétration de la solution dans les pores des cubes puis laissé au repos pour permettre la polymérisation du réseau de fibrine. Les différentes expérimentations ont montré qu'un temps de repos de 24 heures suffisait à une gélification complète des gels. Suite à cela, les récipients ont été mis à tremper dans une solution d'acétone durant 40 heures, puis pour les 8 dernières heures de trempage, les cubes ont été sortis et positionnés dans les paniers métalliques selon une séquence similaire à celle détaillée dans la Deuxième partie. Les étapes de séchage n'ont pas été modifiées par rapport à celles déjà rapportées dans ce travail.

Les observations en microscopie électronique à balayage des cubes ainsi modifiés montrent la présence d'un réseau fibreux à la surface et à l'intérieur des pores du cube de céramique biphasique (Figure 62).

De plus, les mesures effectuées au porosimètre à mercure mettent en évidence d'une part une diminution de la taille des pores de la céramique due à l'introduction de la mouse de lysat plaquettaire dans le réseau poreux de la céramique et d'autre part l'apparition d'une porosité secondaire correspondant à la porosité du réseau organique fibreux (Figure 63).

Il est intéressant de noter que les modifications observées sur la taille des pores sont d'autant plus importantes que la taille des pores de la céramique est importante. Ces modifications sont présentées dans le tableau 17.

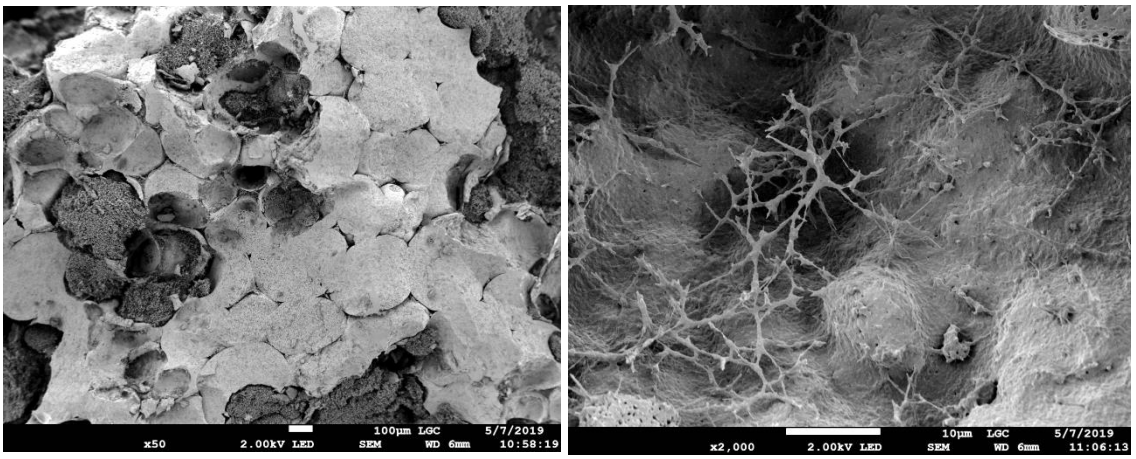

Figure 62 : Observations en microscopie électronique à balayage sans métallisation des cubes de céramiques de phosphates de calcium biphasiques enrichis d'un réseau sec de fibrine. L'observation de gauche montre la surface d'un cube et les fibres qui occupent les pores du matériau minéralisé. L'observation de droite est un grossissement d'un des pores du cube.

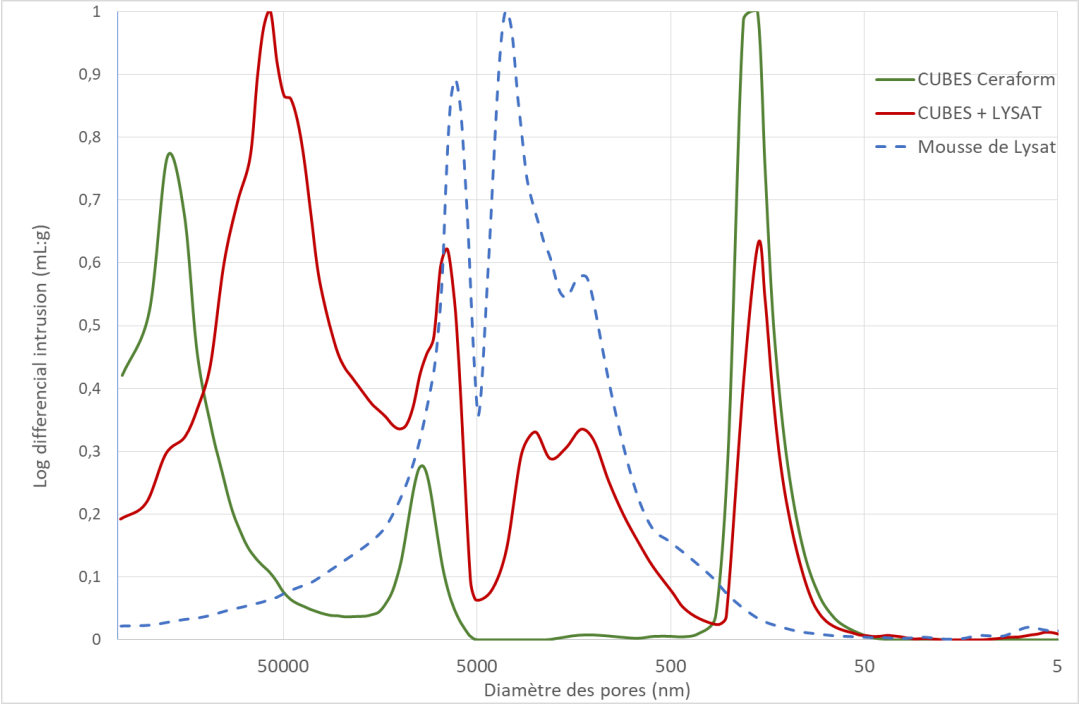

Figure 63 : Distribution de la taille des pores obtenue au porosimètre à mercure sur les composés de référence : cubes Ceraform® et mousse sèche de lysat plaquettaire, ainsi que sur les cubes dans lesquels nous avons introduit la mousse de lysat.

Tableau 17 : Modifications de la taille des pores des cubes Ceraform® et des mousses sèches de LP lors de leur association au sein d'un biomatériau composite..

Taille des pores initiale des composés (provenance)	Porosité du composite « Céramique + mousse »	Commentaires
190 µm (céramique) →	60 µm et 45 µm	La diminution d'environ 70% de la taille des pores de la céramique est liée à la capacité du gel à pénétrer les pores de diamètre important
10 µm (céramique) →	9,5 µm	La diminution de la taille des pores de 10 µm de diamètre n'est pas significative. Ce qui signifie que la viscosité du liquide qui compose le gel avant polymérisation ne permet pas à ce dernier de pénétrer dans cette partie du réseau poreux
7 µm (Mousse de lysat) →	7 µm	Les dimensions du réseau poreux de la mousse ne semblent pas affectées par son positionnement au sein du réseau de la céramique
3,5 µm (Mousse de lysat) →	3,2 µm	Les différences de taille de pores ne sont pas significatives
1,5 µm (Mousse de lysat) →	1,4 µm	Les différences de taille de pores ne sont pas significatives
190 nm (céramique) →	180 nm	Les différences de taille de pores ne sont pas significatives mettant en évidence le fait que le liquide ne pénètre pas dans les pores de cette dimension

c. *Perspective : fonctionnalisation des mousses par incorporation d'espèces ioniques actives*

Il est avéré que les tissus de l'organisme contiennent des ions, ce qui implique que les lysats plaquettaires en contiennent. Chen et *al.* ont d'ailleurs récemment dosé le contenu des LP en ions sodium (155,25 ± 5,06 mEq/L), chlore (68,75 ± 2,06 mEq/L), potassium (4,48 ± 0,22 mEq/L), calcium (8,38 ± 0,21 mg/dL), phosphate (4,08 ± 0,61 mg/dL), magnésium (2 ± 0,08 mg/dL) et fer (88,5 ± 22,78 µg/dL) [12].

D'autres espèces ioniques dotées de propriétés biologiques pourraient être ajoutées à la solution de lysat plaquettaire pour être incorporées dans la future mousse sèche apportant ainsi d'autres propriétés biologiques intéressantes. En effet, l'utilisation récente d'ions

bioactifs ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine des biomatériaux en leur permettant d'élargir l'arsenal thérapeutique des chirurgiens tout en évitant certains traitements au long court qui apparaissent souvent inefficaces pour traiter des infections locales liées à l'implantation. Quelques ions connus pour leur activité biologiques sont référencés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Espèces ioniques qui, du fait de leurs propriétés biologiques, pourraient être utilisées pour fonctionnaliser encore davantage les mousses sèches de lysat plaquettaire et les biomatériaux composites associant ces mousses à des céramiques de phosphate de calcium.

Elément / Espèce ionique	Naturellement présent dans l'organisme	Principales propriétés d'intérêt
Cuivre / Cu^{2+}	Oui	- Favorise l'angiogenèse [13] - Promeut la production d'ostéoblastes [14,15] - Antibactérien par son action perméabilisante sur les membranes plasmiques bactériennes [16,17] - Bactériostatique par le blocage de la réplication de l'ADN bactérien [18,19] - Action particulièrement efficace contre les bactéries Gram positif [14]
Magnésium / Mg^{2+}	Oui	- Stimule la formation osseuse [20,21]
Strontium / Sr^{2+}	Oui	- Stimule l'activité des ostéoblastes, notamment leur synthèse de collagène [22,23]
Zinc / Zn^{2+}	Oui	- Aide à la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses vers les lignées osseuses [24] - Limite la résorption osseuse par une inactivation des ostéoclastes [25] - Stimule l'activité des ostéoblastes [26,27] - Anti-inflammatoire par son action sur les radicaux libres [28] - Bactériostatique par son action inhibitrice sur la réplication de l'ADN bactérien [18,29]
Argent / Ag^{+}	Non	- Bactériostatique par son action inhibitrice sur la prolifération bactérienne [30,31] - Bactériostatique par son action inhibitrice sur la réplication de l'ADN bactérien [32] - Inhibe la formation des biofilms bactériens [33,34] - Antibactérien par son action perméabilisante sur la membrane plasmique des bactéries [35] - Antibactérien par son action inhibitrice de la synthèse d'énergie dans les bactéries [36] - Actif sur les bactéries Gram positif et Gram négatif [37] - Agent antiviral [38]

L'incorporation de ces éléments bioactifs dans les mousses pourront être entreprises en utilisant des solutions à base de chlorures (chlorure d'argent, de zinc…) par exemple. Ces solutions remplaceront en partie celle de $CaCl_2$ afin de respecter le contenu en chlore des hydrogels. Ainsi, la concentration massique de $CaCl_2$ étant de 10 %, celle de $ZnCl_2$ par exemple devra l'être aussi. En souhaitant remplacer 10 % du chlorure de calcium (présent à raison de 49,6 µL par millilitre de gel d'après les calculs menés précédemment) par du chlorure de zinc, cela signifie qu'il faudra 4,96µL de la solution de $ZnCl_2$ par millilitre de gel.
Le zinc étant connu comme étant un agent favorisant les mécanismes d'hémostase [39,40], le temps de polymérisation des hydrogels ne devrait pas être modifié par rapport aux hydrogels conventionnels.
Une fois la polymérisation terminée, le protocole appliqué pour aboutir au séchage du matériau au CO_2 supercritique restera inchangé avec les trempages en acétone et l'incubation dans le sécheur à CO_2 supercritique.

Ce protocole d'incorporation d'espèces ioniques dans les mousses pourra également être entrepris en même temps que l'incorporation de nanocristaux de phosphate de calcium (tels que décrite précédemment avec les échantillons Min-CaP1,16 et Min-CaP1,16-AT).
Toutefois il faut s'attendre avec certains ions à ce que les phases cristallines formées soient différentes de celles précédemment obtenues. LeGeros et *al.* ont par exemple déjà montré dans leurs travaux que les ions Zn^{2+} limitaient la cristallisation des apatites et des DCPD, aboutissant à la formation d'amorphes [41].Une analyse préliminaire, que nous avons mené sur des échantillons Min-PCa1,16 dans lesquels une solution de chlorure de zinc avait été incorporée, montre en effet des phases minérales caractéristiques de phosphates de calcium amorphes (Figure 64) [42]. Cela est confirmé par les analyses DRX préliminaires (Figure 65) qui montrent des halos de diffusion caractéristiques des phases amorphes.

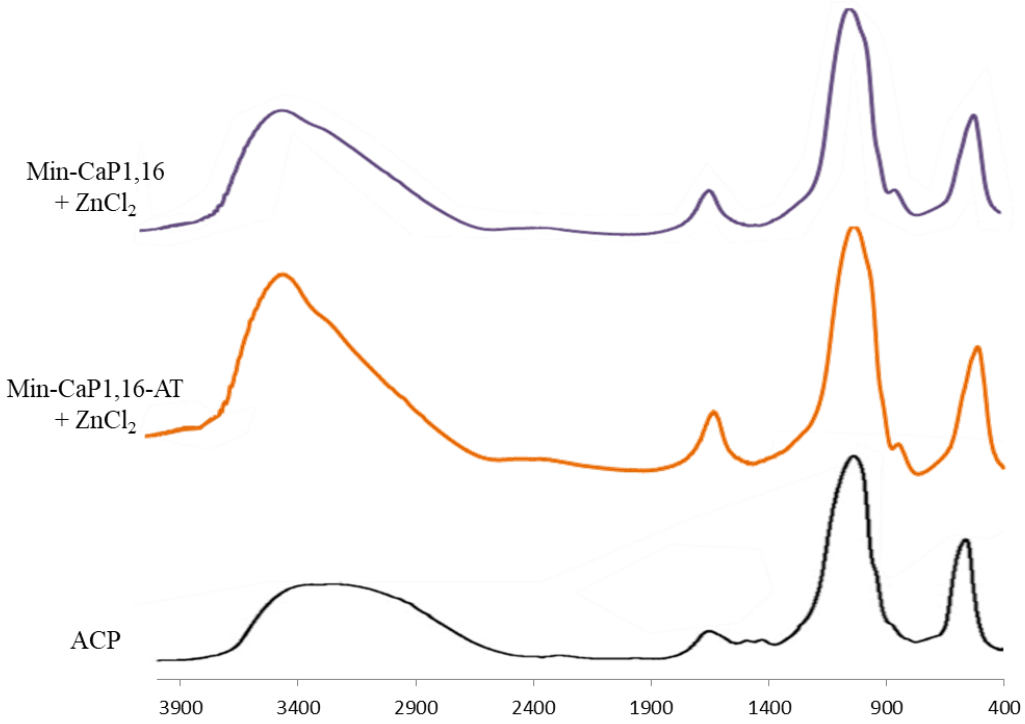

Figure 64 : Analyse FTIR des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ + $ZnCl_2$ et de Na_2HPO_4 en présence (courbe orange) ou en l'absence (courbe violette) d'acide tranexamique. La courbe de référence correspond à des phosphates de calcium amorphes [43].

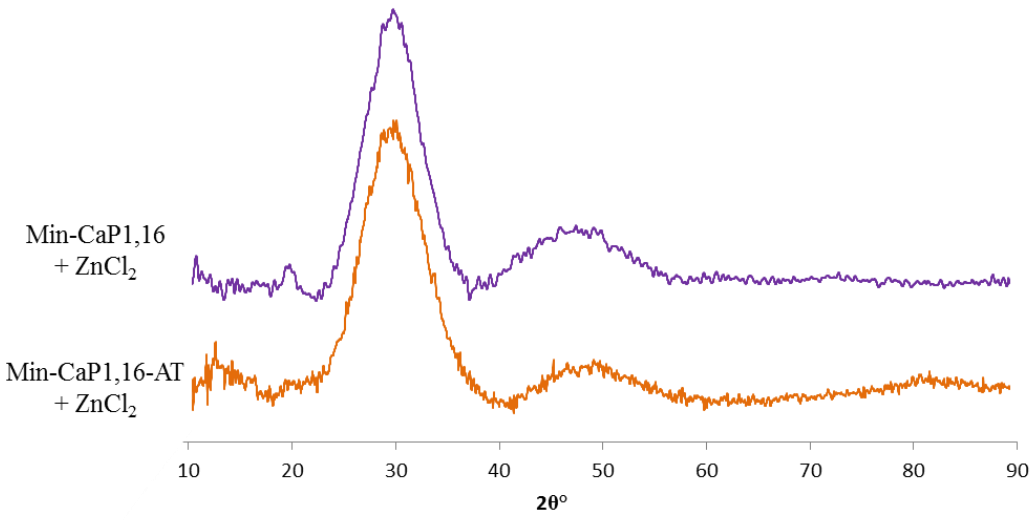

Figure 65 : Analyse DRX des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ + $ZnCl_2$ et de Na_2HPO_4 en présence (courbe orange) ou en l'absence (courbe violette) d'acide tranexamique.

II. Discussion

Les résultats présentés dans cette partie montrent que nous pouvons modifier la structure et la composition des mousses sèches de lysat plaquettaire en y incorporant des nanocristaux phosphocalciques ou en associant le réseau de fibrine à des cubes de céramiques biphasiques pour créer des biomatériaux composites. Les perspectives que nous avons évoquées visant à ajouter des espèces ioniques actives dans les mousses nous permettent d'envisager une modification également de leur activité biologique.

L'apport de ces modifications permettra donc de conférer aux mousses une composition plus proche de celle d'un tissu osseux naturel, de modifier sa bioactivité et d'améliorer éventuellement ses propriétés mécaniques. Ces dernières n'ont pas sensiblement été modifiées lorsque des nanocristaux de phosphate de calcium ont précipité dans le gel de lysat plaquettaire mais il serait malgré tout intéressant de pouvoir agir sur ce paramètre pour limiter l'effritement des mousses à la pression.

Le fait de devoir constituer un hydrogel au début du procédé de fabrication des mousses est un avantage pour incorporer des nanocristaux. En effet la présence d'eau semble indispensable à la formation de composés apatitiques dans la mesure où elle permet les phénomènes de dissolution/reprécipitation à l'origine de la constitution de ces cristaux [44]. L'utilisation du CO_2 supercritique pour sécher le réseau de fibres permet ensuite de stabiliser toute la structure fibreuse et cristalline obtenue pour la conserver dans le temps. Lors de leur réhydratation, les cristaux interagiront de nouveau avec une phase aqueuse ce qui aura pour effet d'entrainer la mobilité des espèces ioniques situés dans la couche non-apatitique hydratée à la surface de ces cristaux [44]. C'est la raison pour laquelle on dit que les nanocristaux phosphocalciques sont très réactifs [45].

Des essais *in vitro* de culture cellulaire et *in vivo* d'implantation chez l'animal semblables à ceux menés dans la Troisième partie de cette Thèse s'avèreront nécessaires sur toutes les structures nouvellement fonctionnalisées. Nous pourrons alors quantifier la valeur ajoutée de l'apport en zinc, cuivre, argent, etc., par rapport aux mousses de départ. Cela permettra de s'assurer que les modifications apportées n'ont en rien changé ni la biocompatibilité ni la bioactivité des matrices déjà riches en facteurs de croissance.

Ces espèces ioniques, que nous avons proposé d'inclure dans les hydrogels de LP au moment de leur polymérisation, pourraient également être directement déposées à la surface des cubes de céramiques phosphocalciques biphasiques utilisées ensuite en association avec le gel de lysat plaquettaire. Ces matériaux phosphocalciques pouvant être modifiés en surface par la précipitation d'espèces ioniques actives [46], il s'agirait là d'une autre possibilité pour fonctionnaliser le réseau fibreux avec des espèces ioniques, sans modifier les proportions des constituants dans l'hydrogel. Le passage au CO_2 supercritique de l'ensemble ne pourra qu'entraîner de nouvelles précipitations de phosphates de calcium [47] avec un biomimétisme accru vis-à-vis du tissu osseux naturel.

L'ensemble de ces essais et la validation des propriétés biologiques des matériaux constitueront des arguments de poids pour envisager une future utilisation des mousses chez l'Homme. Nous allons développer ses indications et le cadre règlementaire qui les accompagnent dans la Cinquième partie. Selon le type d'utilisation envisagée pour les mousses, les étapes protocolaires à respecter pour faire valider le nouveau matériau seront différentes.

III. Références de la quatrième partie

[1] Canceill T, Kemoun P, Joniot S, Casteilla L, Planat-Benard V, Monsarrat P. A fibrin-based hydrogel for adipose mesenchymal stem cells graft: a suitable biomaterial for periodontal tissue engineering? Poster 2, Paris, France: 2017.

[2] Fortunato TM, Beltrami C, Emanueli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. Sci Rep 2016;6:25326. https://doi.org/10.1038/srep25326.

[3] Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. J R Soc Interface 2007;4:999–1030. https://doi.org/10.1098/rsif.2007.0220.

[4] Larousse É. Biomimétisme. Dict Fr Larousse 2019.

[5] Ramadan Y, González-Sánchez MI, Hawkins K, Rubio-Retama J, Valero E, Perni S, et al. Obtaining new composite biomaterials by means of mineralization of methacrylate hydrogels using the reaction–diffusion method. Mater Sci Eng C 2014;42:696–704. https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.017.

[6] Migaki EA, Melhart BJ, Dewar CJ, Huston RK. Calcium Chloride and Sodium Phosphate in Neonatal Parenteral Nutrition Containing TrophAmine. J Parenter Enter Nutr 2012;36:470–5. https://doi.org/10.1177/0148607111420154.

[7] Travers RJ, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate, platelets, and coagulation. Int J Lab Hematol 2015;37:31–5. https://doi.org/10.1111/ijlh.12349.

[8] Li X, Song T, Chen X, Wang M, Yang X, Xiao Y, et al. Osteoinductivity of Porous Biphasic Calcium Phosphate Ceramic Spheres with Nanocrystalline and Their Efficacy in Guiding Bone Regeneration. ACS Appl Mater Interfaces 2019;11:3722–36. https://doi.org/10.1021/acsami.8b18525.

[9] Hong Y, Fan H, Li B, Guo B, Liu M, Zhang X. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. Mater Sci Eng R Rep 2010;70:225–42. https://doi.org/10.1016/j.mser.2010.06.010.

[10] Banu M. Mise en forme d'apatites nanocristallines : céramiques et ciments. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, 2005.

[11] Fowler BO, Markovic M, Brown WE. Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra. Chem Mater 1993;5:1417–23. https://doi.org/10.1021/cm00034a009.

[12] Chen M-S, Wang T-J, Lin H-C, Burnouf T. Four types of human platelet lysate, including one virally inactivated by solvent-detergent, can be used to propagate Wharton jelly mesenchymal stromal cells. New Biotechnol 2019;49:151–60. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.003.

[13] Barralet J, Gbureck U, Habibovic P, Vorndran E, Gerard C, Doillon CJ. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release. Tissue Eng Part A 2009;15:1601–9. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0370.

[14] Sahithi K, Swetha M, Prabaharan M, Moorthi A, Saranya N, Ramasamy K, et al. Synthesis and characterization of nanoscale-hydroxyapatite-copper for antimicrobial activity towards bone tissue engineering applications. J Biomed Nanotechnol 2010;6:333–9. https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1138.

[15] Gomes S, Vichery C, Descamps S, Martinez H, Kaur A, Jacobs A, et al. Cu-doping of calcium phosphate bioceramics: From mechanism to the control of cytotoxicity. Acta Biomater 2018;65:462–74. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.028.

[16] Borkow G, Gabbay J. Copper as a biocidal tool. Curr Med Chem 2005;12:2163–75. https://doi.org/10.2174/0929867054637617.

[17] Ohsumi Y, Kitamoto K, Anraku Y. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. J Bacteriol 1988;170:2676–82. https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2676-2682.1988.

[18] Stanić V, Dimitrijević S, Antić-Stanković J, Mitrić M, Jokić B, Plećaš IB, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. Appl Surf Sci 2010;256:6083–9. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.03.124.

[19] Ueda K, Morita J, Yamashita K, Komano T. Inactivation of bacteriophage phi X174 by mitomycin C in the presence of sodium hydrosulfite and cupric ions. Chem Biol Interact 1980;29:145–58. https://doi.org/10.1016/0009-2797(80)90029-0.

[20] Revell PA, Damien E, Zhang XS, Evans P, Howlett CR. The Effect of Magnesium Ions on Bone Bonding to Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy Implants. Key Eng Mater 2003;254–256:447–50. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.254-256.447.

[21] Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. J Biomed Mater Res 2002;62:175–84. https://doi.org/10.1002/jbm.10270.

[22] Pina S, Vieira SI, Rego P, Torres PMC, da Cruz e Silva O a. B, da Cruz e Silva EF, et al. Biological responses of brushite-forming Zn- and ZnSr- substituted beta-tricalcium phosphate bone cements. Eur Cell Mater 2010;20:162–77. https://doi.org/10.22203/ecm.v020a14.

[23] Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y, et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res 1996;11:1302–11. https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110915.

[24] Ikeuchi M, Ito A, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Yonemasu K, et al. Osteogenic differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. J Biomed Mater Res A 2003;67:1115–22. https://doi.org/10.1002/jbm.a.10041.

[25] Moonga BS, Dempster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res 1995;10:453–7. https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100317.

[26] Li X, Sogo Y, Ito A, Mutsuzaki H, Ochiai N, Kobayashi T, et al. The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2009;29:969–75. https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.021.

[27] Ito A, Kawamura H, Otsuka M, Ikeuchi M, Ohgushi H, Ishikawa K, et al. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. Mater Sci Eng C 2002;22:21–5. https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00108-X.

[28] Mariani E, Mangialasche F, Feliziani FT, Cecchetti R, Malavolta M, Bastiani P, et al. Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. Exp Gerontol 2008;43:445–51. https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.10.012.

[29] Phan T-N, Buckner T, Sheng J, Baldeck JD, Marquis RE. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. Oral Microbiol Immunol 2004;19:31–8. https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2003.00109.x.

[30] Shi C, Gao J, Wang M, Fu J, Wang D, Zhu Y. Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2015;55:497–505. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.078.

[31] Riaz M, Zia R, Ijaz A, Hussain T, Mohsin M, Malik A. Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2018;90:308–13. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.076.

[32] Chambers CW, Proctor CM, Kabler PW. Bactericidal Effect of Low Concentrations of Silver. J - AWWA 1962;54:208–16. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1962.tb00834.x.

[33] Sheng Z, Liu Y. Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. Water Res 2011;45:6039–50. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.065.

[34] Grün AY, App CB, Breidenbach A, Meier J, Metreveli G, Schaumann GE, et al. Effects of low dose silver nanoparticle treatment on the structure and community composition of bacterial freshwater biofilms. PloS One 2018;13:e0199132. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199132.

[35] Bai X, Sandukas S, Appleford M, Ong JL, Rabiei A. Antibacterial effect and cytotoxicity of Ag-doped functionally graded hydroxyapatite coatings. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2012;100B:553–61. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31985.

[36] Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials 2004;25:4383–91. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.078.

[37] Ciobanu CS, Iconaru SL, Le Coustumer P, Constantin LV, Predoi D. Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanoscale Res Lett 2012;7:324. https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-324.

[38] Galdiero S, Falanga A, Vitiello M, Cantisani M, Marra V, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. Mol Basel Switz 2011;16:8894–918. https://doi.org/10.3390/molecules16108894.

[39] Vu TT, Fredenburgh JC, Weitz JI. Zinc: an important cofactor in haemostasis and thrombosis. Thromb Haemost 2013;109:421–30. https://doi.org/10.1160/TH12-07-0465.

[40] Tubek S, Grzanka P, Tubek I. Role of zinc in hemostasis: a review. Biol Trace Elem Res 2008;121:1–8. https://doi.org/10.1007/s12011-007-8038-y.

[41] LeGeros RZ, Mijares DQ, Park J, Chang X-F, Khairoun I, Kijkowska R, et al. Amorphous Calcium Phosphates (ACP): Formation and Stability. Key Eng Mater 2005;284–286:7–10. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.284-286.7.

[42] Ben-Nissan B, editor. Advances in Calcium Phosphate Biomaterials. vol. 2. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0.

[43] Combes C, Rey C. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials. Acta Biomater 2010;6:3362–78. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.017.

[44] Drouet C, Aufray M, Rollin-Martinet S, Vandecandelaère N, Grossin D, Rossignol F, et al. Nanocrystalline apatites: The fundamental role of water. Am Mineral 2018;103:550–64. https://doi.org/10.2138/am-2018-6415.

[45] Drouet C, Bosc F, Banu M, Largeot C, Combes C, Dechambre G, et al. Nanocrystalline apatites: From powders to biomaterials. Powder Technol 2009;190:118–22. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2008.04.041.

[46] Aubry C. Procédé innovant utilisant le CO2 haute pression pour la modification et la fonctionnalisation de phosphates de calcium. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'Université de Toulouse. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2019.

[47] Autefage H, Briand-Mésange F, Cazalbou S, Drouet C, Fourmy D, Gonçalvès S, et al. Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate porous ceramics. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009;91:706–15. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31447.

Cinquième partie : indications et cadre légal de l'utilisation clinique des mousses de lysat plaquettaire

La caractérisation des mousses de lysat plaquettaire a permis de mettre en évidence les intérêts physiques et biologiques de leur utilisation en régénération tissulaire. Cependant le passage des analyses en laboratoire aux premiers essais chez l'Homme nécessite au préalable d'éclaircir le cadre règlementaire d'utilisation de ces nouveaux biomatériaux.

Note : une partie de ces travaux ont été réalisés avec l'aide précieuse de Mmes Eléonore ADREY, et Mégane DANTIN, stagiaires de Master 2 (Mention Procédés de Production et Qualité des Produits de Santé) que nous avons co-encadrées avec Mme. Sophie CAZALBOU en janvier 2020.

I. Indications et futures applications de la mousse de lysat plaquettaire

1. Comme biomatériau utilisé en régénération tissulaire

Les résultats présentés dans les parties précédentes permettent de qualifier le nouveau matériau comme une mousse naturellement riche en protéines, facile à manipuler et réhydratable. Le contenu très important en facteurs de croissance, en cytokines et en autres protéines permet d'envisager la cicatrisation chronique de plaies des tissus mous (peau et muqueuses) et des tissus durs (os et cartilage) (Tableau 19). Les propriétés mécaniques des mousses seules peuvent être limitantes pour une implantation dans des sites anatomiques soumis à des contraintes mécaniques importantes, cependant les améliorations que nous avons décrites dans la Quatrième Partie pourront permettre de renforcer leur résistance sous contrainte. Par comparaison avec les données issues de la littérature, les biomatériaux produits ici présentent des propriétés proches de celles des autres réseaux de fibres produits par

séchage au CO_2 supercritique [1,2], avec l'avantage biologique supplémentaire d'apporter des facteurs de croissance actifs dans sa structure.

Tableau 19 : Indications pour l'utilisation clinique des mousses de lysat plaquettaire et tissus concernés.

Tissus cibles	Indications
Tissu cutané dans son ensemble	- Plaies chroniques associées au diabète par exemple - Cicatrisation des plaies chez les grands brûlés
Os	- Fracture avec retard de cicatrisation - Lacune osseuse (après exérèse kystique ou métastatique par exemple)
Autres tissus	- Structure du parodonte (os alvéolaire, cément, ligament)

Un des défis de l'utilisation clinique de ces biomatériaux reste leur forme galénique qui devra être adaptée aux conditions anatomiques des sites d'implantation. La constitution des hydrogels est en réalité possible dans des contenants de formes diverses, ce qui permet de constituer plutôt des cubes de matériau, des cylindres, des patchs ronds, des patchs carrés ou de toute autre géométrie. Sa capacité à être fractionné permet aussi d'imaginer son utilisation sous forme de fragments de faible dimension voire de poudre.

<u>Faut-il envisager une utilisation autologue ou allogénique ?</u>

Comme nous l'avons abordé précédemment, les pools de lysats plaquettaires commercialisés pour les laboratoires sont constitués à partir de prélèvements sanguins périmés et correspondent à des pools de prélèvements de plusieurs dizaines de donneurs différents. De fait, ces produits ne possèdent pas d'autorisation d'utilisation en clinique, étape qu'il faudra surmonter si la mousse sèche doit être commercialisée et selon la règlementation que nous détaillerons plus bas. L'obtention des autorisations nécessaires dépendra également des indications retenues pour le biomatériau.

L'utilisation autologue, idéale pour une médecine personnalisée, pourrait permettre de franchir plus aisément les barrières règlementaires. Cependant la conception du lysat plaquettaire à partir du prélèvement chez le patient puis la mise en œuvre du procédé de séchage demandent des étapes de laboratoire et durent plusieurs jours. Le prélèvement sort donc du bloc opératoire.

La comparaison entre le mode d'utilisation autologue et allogénique est présentée dans le Tableau 20.

Le recours à la mousse de lysat plaquettaire présente, quelle que soit son origine, l'avantage pour les praticiens de ne plus forcément avoir à investir dans le matériel de prélèvement sanguin au cabinet. En effet, alors que la préparation des concentrés plaquettaires autologues en pratique libérale se fait au bloc opératoire, depuis la prise du sang jusqu'à la fin de la centrifugation, l'implantation du matériau présenté ici devra se faire de façon différente. Sa conception nécessite des étapes de laboratoire et le praticien pourra obtenir un produit fini directement plutôt que de le produire par lui-même.

Tableau 20 : Avantages et inconvénients des perspectives d'utilisation autologue ou allogénique des mousses de lysat plaquettaire chez l'Homme.

	Origine autologue	**Origine allogénique**
Avantages	- Protéines du patient - Biocompatibilité optimale	- Grandes quantités disponibles - Quantités de facteurs de croissance harmonisées entre les lots
Inconvénients	- Prélèvement important pour avoir suffisamment de LP - Inadapté si le patient présente une pathologie de la coagulation, infectieuse…	- Traitement indispensable de déleucocytation - Cadre règlementaire peut être plus complexe

Un exemple de perspective d'application clinique : la régénération parodontale

Les parodontites sont des pathologies orales immuno-infectieuses aux mécanismes étiopathogéniques complexes qui sont liées à un déséquilibre entre le facteur étiologique bactérien et les réponses immunitaires de l'hôte [3]. Elles conduisent à la destruction des tissus de soutien de la dent que sont l'os alvéolaire, le ligament desmodontal, la gencive et le cément. Le niveau gingival ne peut être maintenu à son point physiologique et il se produit un déchaussement de l'organe dentaire sur l'arcade [4]. Le traitement des parodontites consiste dans un premier temps à intervenir sur le facteur étiologique en désorganisant le biofilm bactérien et en décontaminant les surfaces dentaires. Cela permet à l'organisme et à ses défenses immunitaires de reprendre le dessus sur l'évolution de la pathologie [5,6]. Dans un second temps, selon les résultats des examens de réévaluation, un traitement chirurgical peut être envisagé. Son objectif est idéalement de régénérer les tissus détruits, sinon au moins de laisser les tissus mous cicatriser et de stabiliser la destruction tissulaire [7–9]. Car en effet la plupart du temps il ne se produit qu'une cicatrisation épithéliale le long de l'organe dentaire sous la forme d'un épithélium long de jonction, sans récupération du niveau osseux d'origine autour de la dent [7,10]. La régénération du parodonte est donc un challenge sur le plan clinique qui a donné lieu à la commercialisation de nombreux substituts osseux mais dont les résultats cliniques sont très variables [7,11]. La grande majorité d'entre eux sont des biomatériaux inertes qui, une fois implantés, servent de structures sur lesquelles les cellules de l'hôte peuvent proliférer [12]. Ne disposant pas de la capacité à stimuler précisément l'activité et la prolifération de certaines cellules, ils ne sont pas impliqués dans la gestion de la compétition cellulaire qui survient au niveau du défaut osseux.

La mousse sèche de lysat plaquettaire trouverait ici une indication dans la régénération des tissus parodontaux car elle serait susceptible d'apporter les éléments suivants :

- Une structure fibreuse poreuse favorable à la prolifération des cellules de l'hôte ;

- Un contenu riche en facteurs de croissance capables de réinitier des processus de cicatrisation sur le site lésé ;
- Une capacité à se réhydrater qui lui permettrait de s'imprégner des fluides biologiques et d'occuper tout l'espace du défaut osseux.

2. Comme biomatériau support de thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est définie par l'Inserm comme la « greffe de cellules afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe » [13]. Elle est essentiellement orientée vers le traitement de pathologies chroniques comme les brûlures, les cancers ou encore l'arthrose [13,14]. La majorité des cellules utilisées sont des CSM, mises en culture au préalable avant injection chez les patients. Il peut aussi être question d'implantation plutôt que d'injection si les cellules sont greffées directement avec le biomatériau sur ou dans lequel elles ont été mises en culture [14].

Les propriétés démontrées des mousses de lysat plaquettaire sur la prolifération de cellules stromales mésenchymateuses ouvrent la voie à leur utilisation comme biomatériau support de l'expansion de lignées cellulaires avant implantation en thérapie cellulaire chez l'Homme. A la différence du lysat plaquettaire seul utilisé comme adjuvant de milieu de culture cellulaire en plaques, le réseau de fibrine présenté dans ce travail s'organise en une structure tridimensionnelle dans laquelle les CSM peuvent se mouvoir, proliférer et interagir comme au sein d'une architecture tissulaire naturelle qui leur offre une surface de plus de 90m² par gramme de matériau pour se multiplier. Le recours à de telles matrices est d'ailleurs largement encouragé de nos jours [15]. La difficulté à surmonter en revanche pour une telle application des mousses de lysat plaquettaire sera d'assurer la désorganisation suffisante du

réseau de fibres pour récupérer les cellules à injecter ensuite, sans les avoir endommagés lors du procédé. Egger et *al.* ont publié en 2019 un protocole qui permet de déstructurer le réseau de fibrine à la demande en appliquant les différentes étapes suivantes :

1. dissociation mécanique du réseau fibreux à l'aide d'une aiguille
2. centrifugation (500g, 5min)
3. élimination de la phase supérieure
4. suspension du culot de cellules dans 2mL de collagénase IA à 2mg/mL
5. incubation pendant 1 heure sous agitation horizontale à 100 tours/min
6. nouvelle centrifugation (500g, 5min)
7. élimination de la phase supérieure
8. suspension des cellules dans le milieu de culture et remise en culture [16].

3. <u>Comme biomatériau support de culture cellulaire en laboratoire</u>

Plusieurs entreprises (MacoPharma en France, PL BioScience en Allemagne, Life Science au Royaume-Uni…) commercialisent des structures à base de lysat plaquettaire pour la culture de cellules en laboratoire. Il s'agit notamment de poudres de lysat plaquettaire lyophilisé à réhydrater avant utilisation (Figure 66). Les mousses sèches que nous avons développées constituent une nouvelle matrice susceptible de venir enrichir la liste des produits disponibles sur le marché d'autant qu'elles sont concevables sous plusieurs formes et plusieurs volumes.

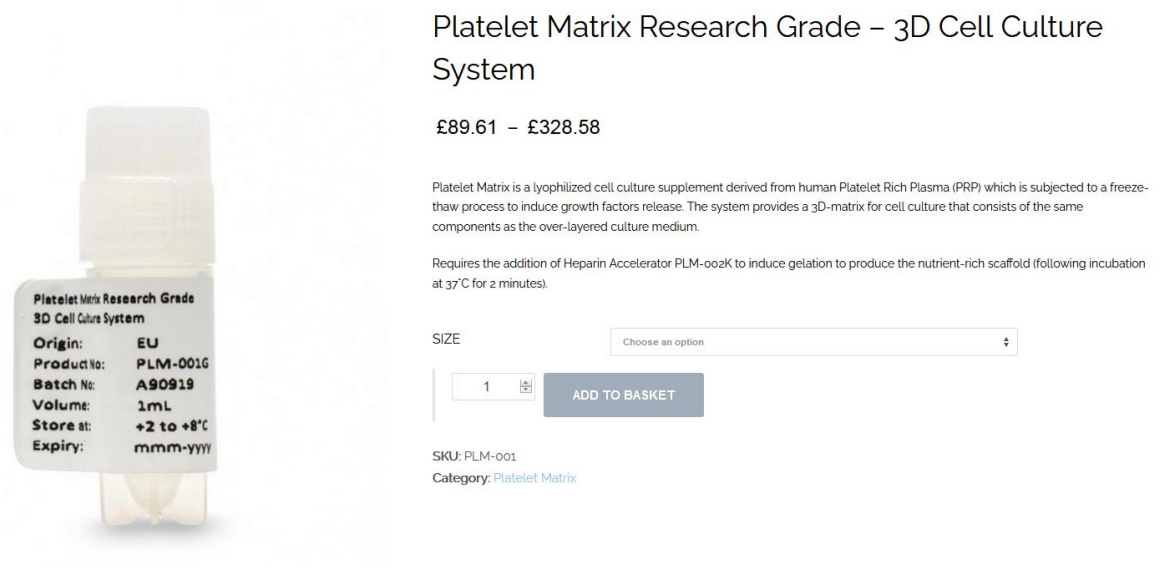

Figure 66 : Produit « Platelet Matrix Research Grade® » correspond à une poudre de lysat plaquettaire lyophilisé commercialisée par la société Life Science au Royaume Uni.

II. Cadre légal de l'utilisation clinique des mousses de lysat plaquettaire

Le cadre règlementaire Français, et Européen d'une manière générale, est très limitant quant au recours aux facteurs de croissance d'origine exogène, pour des pathologies à faible morbidité. C'est là un des avantages du recours à des lysats plaquettaires parce que leur contenu en facteurs de croissance est naturel et qu'ils sont capables de les libérer dans le milieu de façon progressive. Ils vont pouvoir parfaitement répondre à l'impératif de colonisation vasculaire du greffon avec l'apport en oxygène et en nutriments que cela implique [17–19]. Ils pourront également agir de façon paracrine sur les cellules environnantes pour influencer les cellules à proximité de la greffe [20].

Se pose alors la question de savoir quel cadre règlementaire s'applique à la mousse de LP afin de la classifier et de la déclarer dans de bonnes conditions.

1. Les produits sanguins labiles

L'Etablissement Français du Sang (EFS) définit les produits sanguins labiles (PSL) comme « *le produit issu d'un don de sang et destiné à être transfusé à un patient* ». Cela représente trois types de produits : les plasmas, les concentrés de globules rouges et les concentrés de plaquettes. Tous sont déleucocytés pour éviter de causer un rejet par le patient receveur. Chaque famille regroupe plusieurs sous-produits selon le traitement spécifique qui leur est appliqué. Tous sont destinés à une transfusion, ce qui signifie qu'un biomatériau, comme la mousse de lysat plaquettaire, obtenu à partir de prélèvements sanguins modifiés en laboratoire ne rentre plus dans la catégorie des PSL.

2. Les dispositifs médicaux

La définition des dispositifs médicaux (DM) est donnée en France dans le Code de la Santé Publique (CSP). Il s'agit ainsi de « *tout instrument, équipement, matière, produite, à l'exception des produits d'origine humaine, ou tout autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels nécessaires au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens […]* » [21]. L'exclusion par la définition des produits d'origine humaine met un premier frein à la

qualification de la mousse sèche de LP comme un dispositif médical, même si à partir d'un produit sanguin humain des étapes de transformation en laboratoire sont nécessaires pour constituer le biomatériau final. Un second frein est posé par l'exclusion des produits dont l'action est obtenue par des moyens pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques. Ces notions restent mal définies mais une réflexion sur l'action métabolique et éventuellement pharmacologique des facteurs de croissance contenus dans le biomatériau doit être menée.

Au niveau Européen, la règlementation évolue peu à peu car il était fait mention en 2017 d'une « *législation […] lacunaire concernant certains produits fabriqués à l'aide de dérivés de tissus ou de cellules d'origine humaine non viables* » [22]. Le DM est ainsi défini comme « *tout instrument, appareil, équipement, logiciel, implant, réactif, matière ou autre article, destiné par le fabricant à être utilisé seul ou en association, chez l'homme pour l'une ou plusieurs des fins médicales précises suivantes :*

- *diagnostic, prévention, contrôle, prédiction, pronostic, traitement ou atténuation d'une maladie,*
- *diagnostic, contrôle, traitement, atténuation d'une blessure ou d'un handicap ou compensation de ceux-ci,*
- *investigation, remplacement ou modification d'une structure ou fonction anatomique ou d'un processus ou état physiologique ou pathologique,*
- *communication d'informations au moyen d'un examen in vitro d'échantillons provenant du corps humain, y compris les dons d'organes, de sang et de tissus,*

et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens […] » [22]. Les éléments sont sensiblement identiques à ceux

du CSP, cependant les mesures exclusives sont différentes et entretiennent davantage de doute sur la qualification de la mousse de LP en tant que dispositif médical. La Commission Européenne précise par ailleurs que malgré les directives énoncées dans son rapport, chaque Etat membre conserve la liberté d'adapter sa législation au cas par cas.

En revanche, une distinction est faite dans ce même rapport entre les DM et les Dispositifs Implantables (DI), définis comme « *tout dispositif, y compris ceux qui sont absorbés en partie ou en totalité, destiné :*

- *à être introduit intégralement dans le corps humain, ou*
- *à remplacer une surface épithéliale ou la surface de l'œil,*

par une intervention clinique et à demeurer en place après l'intervention.

Est également réputé être un dispositif implantable tout dispositif destiné à être introduit partiellement dans le corps humain par une intervention clinique et à demeurer en place après l'intervention pendant une période d'au moins trente jours » [22]. Si certains DI appartiennent à la plus large famille des DM, il reste à déterminer si un DI peut ne pas être issu de la famille des DM et ainsi comprendre les mousses de lysat plaquettaire (Figure 67).

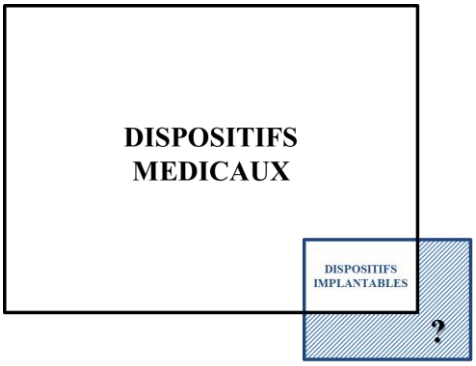

Figure 67 : Illustration schématique de la place occupée par les dispositifs implantables. La zone hachurée laisse planer l'incertitude sur la possibilité pour certains dispositifs ne répondant pas à la définition même des DM d'être implantés.

Ainsi, apporter une conclusion sur la qualification possible en tant que Dispositif Médical de la mousse de LP paraît compliqué. Quatre classes de DM existent, la dernière correspondant plutôt aux indications énoncées précédemment du nouveau matériau :

- Classe I (risque faible) : exemple des lunettes, brancards, béquilles…
- Classe IIa (risque modéré) : exemple des lentilles de contact, couronnes dentaires…
- Classe IIb (risque important) : exemple des solutions de désinfection des lentilles de contact…
- Classe III (risque maximal) : exemple des matériaux implantables…

3. Les médicaments de thérapie innovante

Depuis 2001, la Commission Européenne fait état d'un type particulier de biomatériaux : les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) (ou *Advanced Therapy Medicinal Products*). Dans une mise à jour du texte en 2007, ils sont présentés comme « *ayant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines, ou comme pouvant être utilisés chez l'homme ou administrés à celui-ci en vue de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action principalement pharmacologique, immunologique ou métabolique* » [23]. Toujours d'après le texte, « *ils constituent des médicaments biologiques au sens de l'annexe I de la directive 2001/83/CE […] instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain* » [23].

La référence faite aux modes d'actions pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques reste assez vaste :

- une action pharmacologique fait référence à un médicament à proprement parler, contenant un principe actif. Cela n'est pas le cas ici.

- une action immunologique fait référence à l'influence du matériau sur le système immunitaire. Il ne semble pas que ce soit le rôle principal du biomatériau testé.
- une action métabolique fait appel à une influence sur les phénomènes qui se produisent dans le corps humain et qui permettent le développement, la cicatrisation, etc. La mousse de lysat plaquettaire répondrait à ce mode d'action grâce à son contenu riche en facteurs de croissance.

Il existe 4 types de MTI selon le texte :

- Les médicaments de "thérapie génique" :
    - Généralement pourvus d'acides nucléiques recombinants, leur fonction est d'influencer ou de modifier les séquences génétiques. Cela ne concerne en rien la mousse de lysat plaquettaire.
- Les médicaments "issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire" :
    - Contiennent des cellules ou des tissus « *soumis à une manipulation substantielle de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement* » chez l'être humain [23]. « *Les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur* » [23].
- Les médicaments de "thérapie cellulaire somatique" :
    - Définition similaire aux précédents mais les cellules et les tissus y sont très modifiés pour présenter des fonctions et des caractéristiques structurales différentes de celles d'origine.

- Les médicaments "combinés de thérapie innovante" :
    - Correspondent à une association entre un tissu ou des cellules et un dispositif médical.

Les mousses sèches de lysat plaquettaire s'inscrivent dans ces définitions du Médicament de Thérapie Innovante. La quantification des modifications apportées au tissu sanguin d'origine est difficile mais s'avère nécessaire pour classer le matériau dans les médicaments de thérapie cellulaire somatique ou dans ceux issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire. Une liste de manipulations considérées ou pas comme substantielles est donnée dans l'Annexe I du règlement. Ainsi une modification est substantielle si :

- elle entraîne une modification des propriétés biologiques initiales,
- ou une modification de la fonction initiale
- elle est la succession de modifications non substantielles, ce qui peut conduire à un procédé qui modifie les propriétés des cellules et des tissus et constituer, au final, une modification substantielle.

En cas d'association avec les cubes de phosphate de calcium tel que cela a été présenté dans la Quatrième Partie, le produit final sera considéré comme un médicament combiné de thérapie innovante.

Comme leur nom l'indique, les MTI sont des médicaments, et doivent à ce titre obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) afin de pouvoir être commercialisés. Au niveau Européen, c'est à la Commission Européenne que revient la décision finale de délivrer ou pas l'AMM. Elle s'appuie sur l'avis rendu par l'Agence Européenne du Médicament qui synthétise l'évaluation menée par son Comité des Médicaments à Usage Humain (ou « *Committee for Medicinal Products for Human use* » CHMP en anglais) conjointement avec

le comité d'experts en charge de l'évaluation de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité des MTI : le « *Committee for Advanced Therapies* » (CAT).

Avant de pouvoir déposer le projet de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché, il doit être apporté la preuve que le biomatériau futur MTI respecte divers règlements de sécurité. Les principaux critères à respecter sont résumés dans le Tableau 21.

Si le biomatériau devait être utilisé chez l'enfant, plusieurs règlements pédiatriques sont à respecter comme le texte 1901/2006/CE édité par la Commission Européenne ou encore le Plan d'Investigation Pédiatrique (PIP) approuvé par le Comité Européen Pédiatrique (PDCO) de l'Agence Européenne du Médicament. Ces derniers stipulent notamment l'obligation des essais chez l'enfant, ceux chez l'adulte ne suffisant pas. Le cadre règlementaire s'en trouve davantage renforcé.

Tableau 21 : Principaux critères règlementaires à respecter avant le dépôt d'un dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché d'un Médicament de Thérapie Innovante

Site de fabrication	Bonnes pratiques	Personne responsable	Essais cliniques	Pharmaco-vigilance
Etablissement pharmaceutique public (hors Hôpitaux), associatif ou privé [24]	Règles quant à la production, la distribution et à la traçabilité des lots de MTI [25]	La production doit être sous contrôle d'un pharmacien [26]	La réalisation d'essais avant le dépôt de demande d'AMM est indispensable et très règlementée [27]	Le suivi des évènements indésirables doit être prévu une fois que le MTI sera mis sur le marché

Ainsi, la réglementation et la classification des nouvelles mousses de lysat plaquettaire les orientent vers la famille des Médicaments de Thérapie Innovante. Cela rend plus contraignante la démarche de commercialisation du produit par rapport à celle des dispositifs médicaux puisqu'il faut passer par une demande d'Autorisation de Mise sur le Marché avec les étapes d'évaluation *in vitro, in vivo* et cliniques que cela impose.

III. Références de la Cinquième Partie

[1] Santo VE, Duarte ARC, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Hybrid 3D structure of poly(d,l-lactic acid) loaded with chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles to be used as carriers for biomacromolecules in tissue engineering. J Supercrit Fluids 2010;54:320–7. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.05.021.

[2] Baker KC, Bellair R, Manitiu M, Herkowitz HN, Kannan RM. Structure and mechanical properties of supercritical carbon dioxide processed porous resorbable polymer constructs. J Mech Behav Biomed Mater 2009;2:620–6. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2008.11.006.

[3] Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. J Periodontol 2018;89 Suppl 1:S1–8. https://doi.org/10.1002/JPER.18-0157.

[4] Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000 2006;40:11–28. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x.

[5] Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, et al. Host response mechanisms in periodontal diseases. J Appl Oral Sci Rev FOB 2015;23:329–55. https://doi.org/10.1590/1678-775720140259.

[6] Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol 2014;35:3–11. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001.

[7] Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. Periodontol 2000 1999;19:74–86.

[8] Weinreb M, Nemcovsky CE. In vitro models for evaluation of periodontal wound healing/regeneration. Periodontol 2000 2015;68:41–54. https://doi.org/10.1111/prd.12079.

[9] Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol 2002;13:474–84.

[10] Cole RT, Crigger M, Bogle G, Egelberg J, Selvig KA. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. J Periodontal Res 1980;15:1–9.

[11] Canceill T, Kichenbrand C, Joniot S, Moby V. Les Substituts Osseux en Odontologie. Partie 2 - Classification. BioMatériaux Clin 2019;4.

[12] Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers. Biomatter 2012;2:271–7. https://doi.org/10.4161/biom.22948.

[13] Peschanski M, Jorgensen C. Thérapie cellulaire - Dossier d'Information en Santé de l'INSERM 2015.

[14] Chu D-T, Nguyen TT, Tien NLB, Tran D-K, Jeong J-H, Anh PG, et al. Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications. Cells 2020;9. https://doi.org/10.3390/cells9030563.

[15] Balistreri CR, De Falco E, Bordin A, Maslova O, Koliada A, Vaiserman A. Stem cell therapy: old challenges and new solutions. Mol Biol Rep 2020. https://doi.org/10.1007/s11033-020-05353-2.

[16] Egger D, Oliveira AC, Mallinger B, Hemeda H, Charwat V, Kasper C. From 3D to 3D: isolation of mesenchymal stem/stromal cells into a three-dimensional human platelet lysate matrix. Stem Cell Res Ther 2019;10:248. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1346-2.

[17] Moldovan NI. Angiogenesis, l'enfant terrible of vascular biology is coming of age. J Cell Mol Med 2005;9:775–6.

[18] Marino G, Rosso F, Cafiero G, Tortora C, Moraci M, Barbarisi M, et al. Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. J Mater Sci Mater Med 2010;21:353–63. https://doi.org/10.1007/s10856-009-3840-z.

[19] Bramfeldt H, Sabra G, Centis V, Vermette P. Scaffold vascularization: a challenge for three-dimensional tissue engineering. Curr Med Chem 2010;17:3944–67.

[20] Fortunato TM, Beltrami C, Emanueli C, De Bank PA, Pula G. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. Sci Rep 2016;6:25326. https://doi.org/10.1038/srep25326.

[21] République Française. Article L5211-1 du Code de la Santé Publique : A propos du Régime juridique des dispositifs médicaux. vol. L5211-1. 2010.

[22] Parlement Européen. Règlement (UE) 2017/745 du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne du 5 avril 2017 relatif aux dispositifs médicaux. vol. L117. 2017.

[23] Parlement Européen. Règlement (CE) N°1394/2007 du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante. vol. L324/121. 2007.

[24] République Française. Article L5124-9-1 du Code de la Santé Publique. vol. L5124-9–1. 2011.

[25] République Française. Article L5121-5 Alinéa 1 du Code de la Santé Publique. vol. L5121-5 Alinéa 1. 2016.

[26] République Française. Article 5124-2 du Code de la Santé Publique. vol. L5124-2. 2000.

[27] République Française. Article L1121-1 du Code de la Santé Publique. vol. L1121-1. 2016.

Conclusion générale

Un protocole reproductible de séchage d'hydrogels de lysat plaquettaire grâce à l'utilisation du CO_2 supercritique a ainsi été développé et une demande de brevet a été déposée. Les paramètres du procédé ont été étudiés et adaptés pour déterminer la combinaison la plus efficace pour produire le nouveau biomatériau. Celui-ci se présente sous la forme d'une mousse sèche, véritable matrice extracellulaire composée de fibres de fibrine et naturellement riche en facteurs de croissance. Elle présente les propriétés suivantes :

- Biocompatible, elle favorise la prolifération des cellules stromales mésenchymateuses ;
- Bioactive grâce à son contenu en facteurs de croissance ;
- Stérile ;
- Conservable ;
- Poreuse ;
- Réhydratable, elle est capable d'être imprégnée par les fluides biologiques et pourra s'adapter à la forme de la lésion tissulaire à traiter ;
- Plus facile à manipuler que les hydrogels de lysat plaquettaire.

Sa biocompatibilité et sa bioactivité ont été démontrées *in vitro* et *in vivo* chez la souris, les perspectives de son utilisation future en médecine peuvent s'envisager dans tous les domaines ayant trait à la cicatrisation et à la régénération tissulaire.

La mousse conçue est ainsi créée à partir de produits dérivées du sang d'origine humaine, poolés de plusieurs donneurs pour en harmoniser la composition d'un lot à un autre. La tendance actuelle de la médecine personnalisée cherche constamment à adapter les traitements à la situation personnelle de chaque individu et à utiliser autant que possible des produits autologues pour les procédures thérapeutiques. Même si des étapes de laboratoire sont indispensables à la fabrication des mousses de lysat plaquettaire, une telle démarche pourra être envisagée en autologue.

Chaque composant utilisé pour générer l'hydrogel de départ est un produit validé d'un point de vue pharmaceutique, ce qui ne pourra que faciliter le passage des étapes règlementaires en vue d'entreprendre des essais chez l'Homme. Des indications claires et des pathologies cibles devront pour cela être définies, la forme galénique du matériau étant quoi qu'il en soit adaptable selon les contraintes qui seront décidées. Les constituants choisis ont tous un rôle précis dans le protocole mais ne sont pas des composants exclusifs. Il a ainsi été montré dans ce travail que des modifications de composition et de structure de l'hydrogel – donc du matériau final – pouvaient être menées pour apporter une valeur ajoutée que ce soit en termes de porosité ou de propriétés biologiques notamment.

Le réseau de fibrine séché peut également être combiné à d'autres biomatériaux pour constituer des matrices mixtes. Le contenu en facteurs de croissance et la matrice tridimensionnelle formée par les fibres permet ainsi de fonctionnaliser un biomatériau plus inerte comme les céramiques phosphocalciques biphasiques.

La suite de ces travaux consistera à concevoir des matrices enrichies en différents types de fibres pour apporter davantage d'élasticité à la mousse finale, et à préparer tous les essais nécessaires aux évaluations règlementaires avant une application en étude clinique chez l'Homme. Plusieurs mousses de composition différentes pourront être étudiées selon les indications retenues.

Table des Tableaux

Tableau 1 : Protocoles de préparation des principaux concentrés plaquettaires..... 24

Tableau 2 : Exemples, dans la littérature, de milieux de culture enrichis en lysat plaquettaire pour la culture de divers types cellulaires. 36

Tableau 3 : Etudes précliniques *in vivo* ayant évalué l'utilisation du lysat plaquettaire pour le traitement de diverses pathologies. 41

Tableau 4 : Résumé des études cliniques rapportant l'utilisation de lysat plaquettaire pour le traitement de diverses pathologies.. 45

Tableau 5 : Composition retenue pour la constitution des hydrogels à sécher dans le cadre de ce travail de thèse. 86

Tableau 6 : Contraintes appliquées sur les matrices cylindriques de fibrine de différents volumes à la fin du procédé de séchage au CO_2 supercritique..... 101

Tableau 7 : Flacons nutritifs contenant les microorganismes d'essai. 121

Tableau 8 : Résultats de l'inoculum présentés selon la moyenne des dénombrements réalisés en duplicat pour chaque microorganisme test. 122

Tableau 9 : Résultats de l'incorporation des échantillons dans les bouillons pour valider la méthode d'évaluation de la stérilité. 122

Tableau 10 : Proportions des principaux éléments retrouvés dans les mousses sèches de lysat plaquettaire d'après les analyses EDX. 128

Tableau 11 : Taux de porosité et répartition de la taille des pores par rapport à la porosité totale. 132

Tableau 12 : Volumes et surfaces disponibles pour la croissance et la prolifération cellulaire selon le diamètre des pores dans les mousses sèches de lysat plaquettaire..... 134

Tableau 13 : Volume apparent déterminé sur 6 échantillons à l'aide du porosimètre à mercure sous vide (0,52 psi)..... 135

Tableau 14 : Résistance mécanique des mousses de lysat plaquettaire en compression par rapport aux hydrogels de lysat plaquettaire. 139

Tableau 15 : Temps de libération du VEGF déterminés à partir des courbes pour les mousses sèches, les hydrogels de lysat plaquettaire et le lysat liquide. 143

Tableau 16 : Composition des hydrogels (pour 1mL de volume) constitués avec adjonction de poudres de Na_2HPO_4. 170

Tableau 17 : Modifications de la taille des pores des cubes Ceraform® et des mousses sèches de LP lors de leur association au sein d'un biomatériau composite. 181

Tableau 18 : Espèces ioniques qui, du fait de leurs propriétés biologiques, pourraient être utilisées pour fonctionnaliser encore davantage les mousses sèches de lysat plaquettaire. 182

Tableau 19 : Indications pour l'utilisation clinique des mousses de lysat plaquettaire et tissus concernés. 195

Tableau 20 : Avantages et inconvénients des perspectives d'utilisation autologue ou allogénique des mousses de lysat plaquettaire chez l'Homme. 196

Tableau 21 : Principaux critères règlementaires à respecter avant le dépôt d'un dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché d'un Médicament de Thérapie Innovante 207

Table des Figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une partie de la cascade de coagulation qui aboutit à la stabilisation du caillot de fibrine 15

Figure 2 : Technique de préparation du PRP [26]..... 17

Figure 3 : Obtention du PRP en bloc opératoire (reproduit de [27]). 18

Figure 4 : PRP gélifié par ajout de $CaCl_2$ (reproduit de [28])..... 19

Figure 5 : Méthode de préparation du PRGF [26]. 20

Figure 6 : Différents aspects du PRGF selon qu'il est gélifié par ajout de chlorure de calcium (A, B, C) ou liquide (D) (reproduit de [30])..... 20

Figure 7 : Technique d'obtention du PRF [26]. Il est à noter que la procédure est réalisée dans un tube dépourvu d'anticoagulant..... 22

Figure 8 : Photographie de trois caillots de PRF obtenus au cours d'une intervention de chirurgie orale après prélèvements sanguins chez une patiente puis centrifugation (iconographie personnelle)..... 22

Figure 9 : Technique de préparation dite du *Buffy Coat* [26]..... 24

Figure 10 : Concentrations moyennes des 6 principaux facteurs de croissance retrouvés dans les lysats plaquettaires (TGF-β, PDGF, IGF-1, FGF-2, VEGF et EGF) et calculées d'après les dosages rapportés dans la littérature [17,52–55]..... 27

Figure 11 : Evolution dans le temps du nombre d'études référencées sur PubMed dans lesquelles du lysat plaquettaire est utilisé..... 29

Figure 12 : Infographie présentant les origines des lysats plaquettaires utilisés dans les études expérimentales, pré-cliniques et cliniques (371 études au total)..... 30

Figure 13 : Diagramme température/pression du dioxyde de carbone indiquant ses différents états selon les conditions de température et de pression [1]..... 80

Figure 14 : Changements d'états du dioxyde de carbone visibles dans un sécheur à CO_2 supercritique lors d'une augmentation de la pression et de la température..... 80

Figure 15 : Cinétique de polymérisation obtenue par suivi de la densité optique (DO) à 640nm [13] à une température de 37°C. 85

Figure 16 : Modélisation de la probabilité d'obtenir une polymérisation des hydrogels après une heure à 37°C en fonction des différentes proportions des constituants [13]. 86

Figure 17 : Observation au Microscope Electronique à Balayage Environnemental (après congélation) du réseau de fibres de fibrine ayant polymérisé dans le gel. 87

Figure 18 : Grandes étapes du procédé de séchage par CO_2 supercritique. 88

Figure 19 : Représentation schématique de la cinétique de la pénétration du solvant organique dans le réseau fibreux. 90

Figure 20 : Evolution de la diffusion de solvant (éthanol vs. acétone) dans les gels de lysat plaquettaire. 92

Figure 21 : Détermination du front de diffusion à l'aide du logiciel image J. 93

Figure 22 : Graphe représentant le ratio de diffusion des solvants acétone vs. éthanol par rapport au volume total des gels de lysat plaquettaire (n=12)..... 94

Figure 23 : Photographie de la chambre du sécheur dont la partie inférieure est occupée de CO_2 liquide et la partie supérieure par du CO_2 gazeux. 96

Figure 24 : Photographie de la chambre du sécheur une fois l'état supercritique atteint. L'interface liquide/gaz du CO_2 n'est plus visible. 98

Figure 25 : Exemples de résultats obtenus à l'issue du processus de séchage. 103

Figure 26 : Diagramme présentant l'influence des cinq paramètres majeurs sur la qualité du séchage des hydrogels de lysats plaquettaires par l'utilisation de CO_2 supercritique. 104

Figure 27 : Protocole complet de la conception des mousses sèches de lysat plaquettaire depuis la constitution des hydrogels jusqu'à l'obtention du biomatériau sec. 104

Figure 28 : Représentation schématique du dispositif mis en œuvre pour suivre la cinétique de réhydratation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire. 117

Figure 29 : Réalisation de la gamme étalon du dosage du VEGF par technique ELISA. 124

Figure 30 : Schéma résumant les implantations sous-cutanées chez les deux souris. 126

Figure 31 : Observations des mousses sèches de lysat plaquettaire au microscope électronique à balayage avec métallisation. 127

Figure 32 : Analyse dispersive en énergie (EDX) réalisée sur une mousse sèche de lysat plaquettaire. 128

Figure 33 : Analyse dispersive en énergie (EDX) menée sur les cristaux présents dans le réseau de fibres. 129

Figure 34 : Spectre DRX confirmant la présence de cristaux de NaCl dans le réseau de fibres.. 130

Figure 35 : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier menée sur la mousse sèche de lysat plaquettaire (LP) et comparée au spectre du lysat plaquettaire 131

Figure 36 : Représentation graphique de la distribution des pores dans un échantillon de matériau séché au CO_2 supercritique. 132

Figure 37 : Représentation graphique de la distribution des pores dans les mousses sèches de lysat plaquettaire obtenues selon deux gradients de dépressurisation différents (1,5 $bar.s^{-1}$en rouge ou plus lent 0,15 $bar.s^{-1}$ en bleu). 133

Figure 38 : Observation d'un hydrogel de lysat plaquettaire (à gauche) support de culture de cellules stromales mésenchymateuses issues de tissu adipeux (à droite) au microscope électronique à balayage environnemental après cryofixation. 134

Figure 39 : Schématisation de la tension capillaire qui se crée à l'interface liquide vapeur. 136

Figure 40 : Courbe de dégradation thermique (en violet) de la mousse sèche de lysat plaquettaire et sa dérivée (en vert). 137

Figure 41 : Cinétique d'hydratation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire lors de son trempage dans 20mL d'eau distillée. 138

Figure 42 : Suivi de la dégradation d'une mousse sèche et d'un hydrogel de lysat plaquettaire au cours du temps par dosage de l'intensité du pic d'absorbance à 280 nm (longueur d'ondes caractéristique de protéines du lysat plaquettaire) au spectromètre UV. 141

Figure 43 : Cinétique de libération du VEGF dans le milieu au cours du temps par des mousses sèches (en vert, n=9), des hydrogels de lysat plaquettaire (en bleu, n=4) et du lysat plaquettaire liquide en guise de contrôle (en orange, n=2). 143

Figure 44 : Observations en microscopie optique avec marquage LIVE&DEAD de BM-MSC mises en culture sur les mousses de lysat plaquettaire en plaques de 24 puits. 144

Figure 45 : Coupes histologiques colorées au Trichrome de Masson des mousses sèches de lysat plaquettaire implantées en sous-cutané chez la souris (temps = 15 jours). 146

Figure 46 : Coupes histologiques colorées à l'hémalun-éosine des mousses sèches de lysat plaquettaire implantées en sous-cutané chez la souris (temps = 15 jours). 147

Figure 47 : Coupes histologiques colorées au Trichrome de Masson des biomatériaux laissés à sécher sous hotte à flux laminaire et implantées en sous-cutané chez la souris (temps = 15 jours). 147

Figure 48 : Observations en Microscopie Electronique à Balayage des réseaux de fibrine et du « *coating* » de protéines sur les fibres. 151

Figure 49 : Analyse dispersive en énergie réalisée sur une mousse sèche de lysat plaquettaire dont l'hydrogel initial avait été trempé dans une solution riche en Na_2HPO_4. 163

Figure 50 : Observations au microscope électronique à balayage sans métallisation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire dont l'hydrogel avait été trempé au préalable dans une solution de Na_2HPO_4.. 164

Figure 51 : Analyse dispersive en énergie orientée sur les nouveaux cristaux observés au microscope électronique à balayage sur les échantillons dans lesquels de la poudre de Na_2HPO_4 avait été incorporée. Les bandes du phosphate et du calcium apparaissent clairement. 166

Figure 52 : Observations au microscope électronique à balayage sans métallisation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire dans laquelle une poudre de Na_2HPO_4 avait été incorporée dans la composition du gel avant polymérisation 167

Figure 53 : Diagramme de distribution de la taille des pores contenus dans les mousses de référence (ne contenant pas de Na_2HPO_4) *vs*. les mousse contenant du Na_2HPO_4 168

Figure 54 : Evaluation des propriétés mécaniques des mousses sèches de lysat plaquettaire enrichies ou non de phosphate. Le graphe du haut correspond à la comparaison des contraintes maximales appliquées en compression et celui du bas aux modules de compression des deux matériaux. 169

Figure 55 : Analyse dispersive en énergie orientée sur les nouveaux cristaux observés au microscope électronique à balayage sur les échantillons sans solution de NaCl. Les bandes du phosphate et du calcium apparaissent clairement..... 171

Figure 56 : Observations au microscope électronique à balayage sans métallisation d'une mousse sèche de lysat plaquettaire constituée sans la solution de NaCl. 172

Figure 57 : Précipitation des cristaux de phosphate de calcium en extemporané pour analyser leur composition et leur structure. 173

Figure 58 : Analyse FTIR des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ et de Na_2HPO_4 et en présence ou en l'absence d'acide tranexamique. 175

Figure 59 : Analyse DRX des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ et de Na_2HPO_4 et en présence ou en l'absence d'acide tranexamique.. 175

Figure 60 : Procédures mises en œuvre utilisé pour ajouter les poudres de phosphate de calcium aux hydrogels de lysat plaquettaire..... 177

Figure 61 : Représentation graphique de la distribution des pores dans les cubes Ceraform® de céramique biphasique (35%HA et 65% β-TCP). 178

Figure 62 : Observations en microscopie électronique à balayage sans métallisation des cubes de céramiques de phosphates de calcium biphasiques enrichis d'un réseau sec de fibrine.. . 180

Figure 63 : Distribution de la taille des pores obtenue au porosimètre à mercure sur les composés de référence : cubes Ceraform® et mousse sèche de lysat plaquettaire, ainsi que sur les cubes dans lesquels nous avons introduit la mousse de lysat. 180

Figure 64 : Analyse FTIR des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ + $ZnCl_2$ et de Na_2HPO_4 en présence (courbe orange) ou en l'absence (courbe violette) d'acide tranexamique. 184

Figure 65 : Analyse DRX des cristaux ayant précipité lors du mélange des solutions à base de $CaCl_2$ + $ZnCl_2$ et de Na_2HPO_4 en présence (courbe orange) ou en l'absence (courbe violette) d'acide tranexamique. 184

Figure 66 : Produit « Platelet Matrix Research Grade® » correspond à une poudre de lysat plaquettaire lyophilisé commercialisée par la société Life Science au Royaume Uni. 200

Figure 67 : Illustration schématique de la place occupée par les dispositifs implantables. .. 203

ANNEXE 1 : modalités de la procédure de recherche sur PubMed

Les études pouvaient être incluses s'il s'agissait :

- D'études *in vitro* dans lesquelles le LP était utilisé en tant qu'adjuvant à des milieux de culture cellulaire
- D'études *in vitro* dans lesquelles le LP était utilisé seul ou en association avec d'autres biomatériaux pour la conception de biomatériaux destinés à une utilisation biomédicale
- D'essais *in vivo* chez l'animal dans lesquels le LP était utilisé seul ou en association avec d'autres biomatériaux et/ou des éléments cellulaires pour une utilisation biomédicale
- D'études cliniques chez l'Homme quel qu'en soit leur type (case report, étude observationnelle (transversale, prospective ou rétrospective), essai clinique…) dans lesquelles le LP était utilisé seul ou en association avec d'autres biomatériaux et/ou des éléments cellulaires pour une utilisation biomédicale

Tableau 22 : Procédure de recherche avancée menée sur le moteur de recherche de PubMed le 30 mars 2020

Etape	Différentes étapes de la procédure de recherche	Nombre d'articles identifiés
#1	**((((((((((((platelet derivate) OR (platelet concentrate)) OR (platelet-derived)) OR (prp)) OR (platelet rich plasma)) OR (platelet rich fibrin)) OR (prf)) OR (buffy coat)) OR (buffy-coat)) OR (blood-derived)) OR (blood derived)) OR (l-prf)) OR (a-prf)) OR (prgf)) OR (i-prf)**	476 225
#2	**(lysate) OR (lysis)**	82 563
#3	**#1 AND #2**	6 272
#4	**(((((chinese[Language]) OR (polish[Language])) OR (german[Language])) OR (japanese[Language])) OR (portuguese[Language])) OR (Russian[Language])**	1 883 558

#5	**((review[Publication Type]) OR (systematic review[Publication Type])) OR (meta-analysis[Publication Type])**	2 700 398
#6	**#4 OR #5**	4 385 233
#7	**#3 NOT #6**	5 968

5968 articles ont ainsi été identifiés par le moteur de recherche. Cependant la requête étant très large, il apparaissait évident que les résultats proposés sur PubMed était plus nombreux que le nombre réel de publications à inclure ; un screening manuel s'est donc avéré nécessaire pour écarter les faux positifs grâce aux critères d'exclusions. N'ont ainsi pas été conservés :

- Les articles traitant des techniques de préparation des LP
- Les articles rapportant uniquement l'analyse des constituants des LP
- Les revues de la littérature
- Les méta-analyses
- Les publications concernant les lysats d'autres types cellulaires que les plaquettes (globules rouge notamment)
- Les études portant sur l'action lytique de cellules comme les lymphocytes sur d'autres cellules ou sur des microorganismes (virus, bactéries, parasites…)
- Les articles traitant des plaquettes en tant que telles
- Les articles traitant du sang dans son ensemble.

Au final, 371 publications ont été conservées car elles répondaient parfaitement aux critères d'inclusion énoncés plus haut (Figure 1). Parmi les 371 articles, 310 rapportaient des études *in vitro*, 37 des études *in vivo* (dont 25 présentaient une utilisation directe du lysat plaquettaire c'est-à-dire différente d'un adjuvant pour milieu de culture cellulaire) et 25 des études cliniques (dont 18 présentaient une utilisation directe du LP).

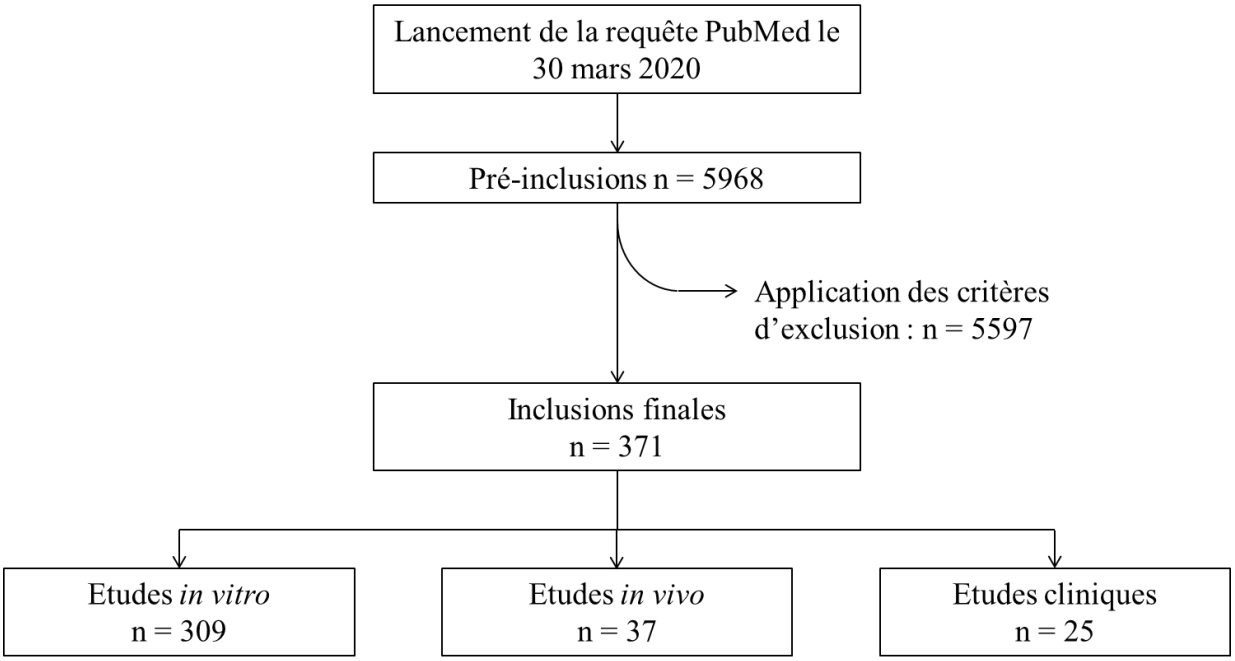

Figure 1 : Diagramme de flux de la revue de la littérature.

Alors que 15 articles seulement ont été publiés entre 1980 et 1989, 53 l'ont été rien que sur l'année 2019. Le nombre d'études menées en clinique chez l'Homme est également en plein essor. Jusque dans les années 2010, les LP étaient effectivement peu communément retrouvés dans des études cliniques mais en revanche plus largement utilisés en recherche *in vitro* comme supplément de milieu de culture cellulaire notamment [53].

Auteur : Thibault CANCEILL
Titre : Développement d'un biomatériau naturel, bioactif, dérivé du sang pour la régénération tissulaire
Résumé Français : Le Lysat Plaquettaire (LP) est un produit dérivé du sang naturellement riche en facteurs de croissance comme le VEGF, le PDGF ou encore le TGF-β1. Cela lui confère la capacité de stimuler les cellules de l'hôte pour promouvoir la cicatrisation voire même la régénération des tissus lésés. Associé à du chlorure de calcium et de l'acide tranexamique, le LP peut former un hydrogel composé d'un réseau tridimensionnel de fibrine, mimant une matrice extracellulaire naturelle riche en facteurs de croissance dans laquelle les cellules trouvent tous les éléments nécessaires à leur développement. Les champs d'application de ces LP sont nombreux et leur utilisation en tant que matériaux bioactifs peuvent concerner toutes les disciplines médicales. L'objectif de cette thèse est de sécher l'hydrogel afin de développer un biomatériau d'origine biologique, à base de lysat plaquettaire, qui réponde au cahier des charges des structures optimisées pour la régénération tissulaire. Le manuscrit s'organise autour de cinq parties : 1) un état de l'art sur le sujet dans la littérature, 2) le protocole de conception du biomatériau, 3) sa caractérisation in vitro et in vivo, 4) les modifications qui peuvent lui être apportées pour optimiser ses performances et enfin 5) le cadre légal et règlementaire de son utilisation future. Le séchage de l'hydrogel de LP est réalisé grâce à l'utilisation du CO2 à l'état supercritique, un procédé permettant d'envisager l'obtention de matériaux secs, poreux et stériles. Ils pourront présenter une longue période de conservation, une manipulation plus aisée que celle des hydrogels, une capacité importante à se réhydrater et également un pouvoir hémostatique. Les observations réalisées au Microscope Electronique à Balayage, ainsi que les analyses au porosimètre à mercure montrent que les mousses sèches présentent une porosité totale de 83,42±4,85% avec des pores dont les diamètres varient entre 3nm et 360µm. Le suivi de la cinétique de relargage du VEGF démontre une libération prolongée de facteurs de croissance dans le temps sans qu'il n'y ait eu de perte au cours du procédé de séchage lorsque les quantités sont comparées à celles contenues dans les gels de départ. La résistance en compression des mousses se trouve supérieure à celle des hydrogels de LP. Les premières études menées in vitro sur des cellules stromales mesenchymateuses et in vivo sur un modèle murin sous-cutané confirment la biocompatibilité des biomatériaux conçus. L'ensemble de ces résultats offre des perspectives prometteuses dans le domaine de la régénération tissulaire et permet d'envisager également l'utilisation des mousses sèches de lysat plaquettaire comme support d'expansion cellulaire dans le cadre de la thérapie cellulaire.
Mots clés : lysat plaquettaire, biomatériaux, régénération tissulaire, facteurs de croissance, matériaux bioactifs.

English Title: Development of a natural, bioactive, blood-derived biomaterial for tissue regeneration.
Abstract: Platelet Lysate (PL) is a blood derivative product naturally rich in growth factors such as VEGF, PDGF or TGF-β1. This gives it the ability to stimulate host cells to promote healing and even regeneration of damaged tissue. Combined with calcium chloride and tranexamic acid, the PL can form a hydrogel composed of a three-dimensional network of fibrin, mimicking a natural extracellular matrix rich in growth factors in which cells find all the elements necessary for their development. The fields of application of these PLs are numerous and their use as bioactive materials can concern all medical disciplines. The objective of this thesis is to dry the hydrogel in order to develop a biomaterial of biological origin, based on platelet lysate, which meets the specifications of structures optimized for tissue regeneration. The manuscript is organized around five parts: 1) a state of the art on the topic in the literature, 2) the protocol designed to obtain the biomaterial, 3) its in vitro and in vivo characterizations, 4) the modifications that can be made to optimize its performances and finally 5) the legal and regulatory framework for its future use. PL hydrogel is dried using CO2 in a supercritical state, a process that makes it possible to obtain dry, porous and sterile materials. They may have a long shelf life, easier handling than hydrogels, and also a high capacity to rehydrate. The observations made by Scanning Electron Microscopy, as well as the analyses with the mercury porosimeter show that the dry foams have a total porosity rate of 83.42±4.85% with pores whose diameters vary between 3nm and 360µm. Monitoring of the VEGF release kinetics shows a prolonged release of growth factors over time without any loss during the drying process when the quantities are compared to those contained in the starting gels. The compressive strength of the foams is higher than that of PL hydrogels. Initial studies conducted in vitro on mesenchymal stromal cells and in vivo in a subcutaneous mouse model confirm the biocompatibility of the designed biomaterials. All these results offer promising prospects in the field of tissue regeneration and also make it possible to envisage the use of dry platelet lysate foams as a support for cell expansion in the context of cell therapy.
Key words: platelet lysate, biomaterials, tissue regeneration, growth factors, bioactive materials