PolyPublie
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Échafaudage cellulaire en nanofibres de polymère et verre bioactif pour la guérison des plaies diabétiques
Auteur: Author:	Paul Leroy
Date:	2023
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Leroy, P. (2023). Échafaudage cellulaire en nanofibres de polymère et verre bioactif pour la guérison des plaies diabétiques [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/55104/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/55104/
Directeurs de recherche: Advisors:	Abdellah Ajji, & Marc Lavertu
Programme: Program:	Génie biomédical

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
affiliée à l'Université de Montréal

Échafaudage cellulaire en nanofibres de polymère et verre bioactif pour la guérison des plaies diabétiques

PAUL LEROY
Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*
Génie biomédical

Août 2023

© Paul Leroy, 2023.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Échafaudage cellulaire en nanofibres de polymère et verre bioactif pour la guérison des plaies diabétiques

présenté par **Paul LEROY**
en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Nick VIRGILIO, président
Abdellah AJJI, membre et directeur de recherche
Marc LAVERTU, membre et codirecteur de recherche
Géraldine MERLE, membre

DÉDICACE

À mes amis, et toutes mes belles rencontres de Montréal,
Ça ne fait que commencer...

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord offrir mes sincères remerciements à mon directeur d'étude, le Professeur Abdellah Ajji, et à mon co-directeur d'étude, Marc Lavertu, pour leur aide durant ce projet et au temps qu'ils m'ont consacré. Leur aide a réellement permis de valoriser mon travail.

Je souhaite remercier Matthieu et Claire, dont l'aide dans les laboratoires a été indispensable à la conclusion de cette recherche et dont la patience a été précieuse lorsque j'utilisais incorrectement une machine.

J'offre aussi mes remerciements à Georges pour le temps et l'énergie qu'il a accordés à mes essais antibactériens et sans qui je n'aurais sans doute pas pu les faire. Merci à Hoda pour ses conseils et son expertise pour ces tests.

Je remercie Anik, Sylvie, Yuan, et Dong pour leur expérience et leur aide lors des différents tests cellulaires que j'ai effectués. C'est bien grâce à eux que j'ai pu avancer aussi efficacement. Merci à Fiona pour son aide pendant les tests mécaniques.

Je souhaite remercier mes parents pour leur soutien inébranlable, pour m'avoir toujours poussé à avancer malgré mes doutes et mes angoisses, et pour l'amour qu'ils m'ont donné durant ces années d'étude. Je souhaite aussi remercier ma grand-mère Cécile pour sa bonne humeur contagieuse. Merci à ma sœur Alix et à ma cousine Ninon que j'ai eu l'impression de retrouver, je vous souhaite le meilleur à tous.

Je veux remercier les amis que j'ai eus à Montréal. Merci à Alex, Samuel et Valentin pour les parties de jeu de rôle endiablées et les soirées jeu de société. Je n'oublierai pas les moments que nous avons passés sur les planches à jouer des personnages plus farfelus les uns que les autres. Merci à Lionel, une de mes belles rencontres de Montréal, dont l'amitié m'a réchauffé le cœur dans les moments difficiles.

Je souhaite remercier mes compagnons de Donjons&Dragons sur Roll20, Alex, Étienne, Sara et Greg. Les aventures que j'ai écrites pour vous ont rythmé mes semaines pendant maintenant plus d'un an, et les moments farfelus, les stratégies improbables et les calembours grinçants m'ont toujours donné une soirée de fun par semaine.

Merci à mes amis Raphaël et Omar, pour un rituel de tournée des boulangeries qui a toujours été bien meilleur avec vous pour m'accompagner, et pour les gin-tonics partagés à refaire le monde.

Merci à Inès, une vraie amie dont le soutien a été inestimable, pour m'avoir aidé à traverser

des périodes compliquées et pour tous ces moments où l'on s'est remis en question. Je te souhaite le plus grand des bonheurs.

Finalement, je souhaite remercier Sierra et Maria, mes belles rencontres de ces derniers mois, pour m'avoir appris de nouvelles choses sur moi-même, et pour m'avoir, même sans le savoir, tant soutenu.

RÉSUMÉ

Une partie des patients diabétiques souffrent de plaies chroniques sur les membres inférieures appelées ulcères diabétiques. Ces plaies sont à l'origine de pertes de qualité de vie et d'argent importantes pour le système de santé et les patients. La longue durée d'ouverture de ces plaies les ouvre à des infections bactériennes, nécessitant parfois des amputations. Cette chronicité est expliquée d'une part par la faible quantité de facteurs de croissance dans ces plaies, et d'autre part par la surproduction de molécules à fort effet collatéral par le système immunitaire. Durant les dernières années, les intérêts de recherche se sont centrés sur la production d'échafaudages cellulaires bioactifs, qui remplacent les tissus abîmés et motivent la croissance de nouveaux tissus pour permettre de fermer la plaie. Depuis un peu plus d'une vingtaine d'années, l'électrofilage a démontré être une technique permettant de fabriquer des fibres nanométriques avec une grande variété de structures et de compositions disponibles. Cette technique a donc attiré l'attention pour la production d'échafaudages cellulaire, notamment dans le cadre des plaies diabétiques. La production de fibres imitant la matrice extracellulaire, biodégradables et bioactives, en est la raison. Le but de ce projet de maîtrise était de développer un échafaudage cellulaire électrofilé et bioactif dans le cadre d'une plaie diabétique.

Dans un premier temps, un premier matériau composé de fibres d'alcool polyvinylique (PVA) et d'alginate a été produit, mais après avoir rencontré de trop nombreux obstacles, notamment la solubilité trop importante, la difficulté de manipulation et la faible quantité de matériau produite, ce matériau a été écarté. Ce matériau devait être la couche supérieure d'une structure bicouche, contenant aussi du chitosane, du verre bioactif, et du plasma riche en plaquettes lyophilisé.

Dans un second temps, un matériau composé de fibres d'acide polylactique (PLA) et de nanoparticules de verre bioactif (nBG), un matériau proangiogénique, antibactérien et promouvant la prolifération cellulaire, a été produit par électrofilage. Une analyse par microscopie électronique a permis de déterminer la taille des fibres et leur morphologie. Un test de traction jusqu'à la rupture a permis de déterminer l'effet de l'incorporation des nanoparticules sur les caractéristiques mécaniques des fibres. Ensuite, des essais *in vitro* ont été réalisés afin de déterminer l'effet de l'échafaudage sur la prolifération et la viabilité de cellules L929. Ces tests ont été menés à l'aide des colorants PrestoBlue HS(invitrogen) et du LIVE/DEAD Cell Imaging Kit(Invitrogen) après 1,3 et 7 jours de culture. Par la suite, des cultures de cellule ont été menées sur les matériaux et leur milieu de culture prélevés et envoyés à Eve Technologies

pour mesurer les concentrations de facteurs proangiogéniques dans ces derniers. Finalement, un test antibactérien a permis de déterminer si les nanoparticules avaient un effet antibactérien sur des bactéries Gram-négatif. Dans ces expériences, les fibres de PLA-nBG étaient comparées à des fibres de PLA pures.

Il n'a pas été possible de produire des fibres de PLA contenant plus de 5% de nanoparticules de verre à cause de la dégradation hydrolytique catalysée par les nBG dans la solution d'électrofilage. Une analyse thermogravimétrique a confirmé que les fibres produites contenaient près de 90% de la masse de nanoparticules ajoutées. Les fibres de PLA-nBG ont un diamètre entre 100 et 250 nm contre entre 0,6 et 1,1 µm pour les fibres de PLA. La présence des nanoparticules n'a pas affecté la rigidité du matériau et a diminué la contrainte et l'élongation à la rupture à 0,9 MPa contre 1,3 MPa et 10% contre 65% respectivement pour les fibres de PLA-nBG et de PLA. La prolifération de cellules L929 après 7 jours était améliorée sur le PLA-nBG comparé au PLA de presque 30%. La viabilité des cellules était aussi améliorée avec un étalement plus important des cellules et une toxicité réduite en présence de nanoparticules, particulièrement notables après 7 jours. La production de certains facteurs proangiogéniques, notamment l'endogline et les facteurs de croissance placentaires (PLGF) a été améliorée, mais la production de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est restée semblable pour les deux matériaux. Aucun effet antibactérien n'a été constaté pour le PLA-nBG après 24 h de culture bactérienne sur ce dernier.

Le matériau présente un intérêt pour la guérison des plaies diabétiques en promouvant la prolifération et la viabilité des cellules ensemencées à sa surface. Le matériau démontre aussi des effets proangiogéniques, même s'ils sont limités. De nouvelles recherches sont nécessaires pour que ce matériau atteigne son plein potentiel. Un solvant différent pour la solution d'électrofilage limiterait la dégradation hydrolytique du PLA en présence de nBG et augmenterait la taille des fibres et des pores du matériau. Des nBG de plus petit diamètre permettraient une meilleure incorporation dans les fibres de PLA et une plus grande réactivité à leur surface. Finalement, des nBG basés sur du borate, contre du silicate dans le cas de cette recherche, pourraient aussi augmenter cette réactivité.

ABSTRACT

A portion of diabetic patients suffer from chronic sores on the lower limbs called diabetic foot ulcers. These wounds are the cause of significant losses in quality of life and money for the health system and patients. The long duration of the opening of these wounds opens them up to bacterial infections, sometimes requiring amputations. This chronicity is explained on the one hand by the low quantity of growth factors in these wounds, and on the other hand by the overproduction of molecules with a strong collateral effect by the immune system. In recent years, research interests have centered on the production of bioactive cellular scaffolds, which replace damaged tissue and motivate the growth of new tissue to help close the wound. For a little over twenty years, electrospinning has proven to be a technique for manufacturing nanoscale fibers with a wide variety of structures and compositions available. This technique has therefore attracted attention for the production of cellular scaffolds, also in the context of diabetic wounds. The production of fibers that mimic the extracellular matrix, are biodegradable and bioactive, is the reason for this interest. The aim of this master's project was to develop an electrospun and bioactive cellular scaffold in the context of a diabetic wound.

Initially, a first material composed of PVA and alginate fibers was produced, but after encountering too many obstacles, including excessive solubility, difficulty in handling and the low quantity of material produced, this material was discarded. This material was to be the top layer of a bilayer structure, also containing chitosan, bioactive glass, and freeze-dried platelet-rich plasma.

Secondly, a material composed of fibers of PLA and nBG, a proangiogenic, antibacterial and cell proliferating material, was produced by electrospinning. An analysis by electronic microscopy made it possible to determine the size of the fibers and their morphology. A tensile test until rupture made it possible to determine the effect of the incorporation of nanoparticles on the mechanical characteristics of the fibers. Then, *in vitro* tests were performed to determine the effect of the scaffold on the proliferation and viability of L929 cells. These tests were carried out using PrestoBlue HS (invitrogen) and the LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (Invitrogen) after 1,3 and 7 days of culture. Subsequently, cell cultures were carried out on the materials and their culture medium collected and sent to Eve Technologies to measure the concentrations of proangiogenic factors in them. Finally, an antibacterial test made it possible to determine whether the nanoparticles had an antibacterial effect on Gram-negative bacteria. In these experiments, PLA-nBG fibers were compared to pure PLA fibers.

It was not possible to produce PLA fibers containing more than 5% glass nanoparticles due to nBG-catalyzed hydrolytic degradation of PLA in the electrospinning solution. A thermogravimetric analysis confirmed that the fibers produced contained almost 90% of the mass of nanoparticles added. PLA-nBG fibers have a diameter between 100 and 250 nm against between 0,6 and 1,1 μm for PLA fibers. The presence of nanoparticles did not affect the stiffness of the material and reduced the ultimate tensile strength to 0.9 MPa against 1.3 MPa for PLA fibers. Proliferation of L929 cells after 7 days was improved on PLA-nBG compared to PLA by almost 30%. Cell viability was also improved with greater cell spreading and reduced toxicity in the presence of nanoparticles, particularly notable after 7 days. The production of certain proangiogenic factors, in particular endoglin and PLGF was improved, but the production of VEGF remained similar for the two materials. No antibacterial effect was observed for PLA-nBG after 24 h of bacterial culture on the material.

The material has potential for the healing of diabetic wounds by promoting the proliferation and viability of cells seeded on its surface. The material also demonstrates proangiogenic effects, albeit limited. Further research and improvements are needed for this material to reach its full potential. A different solvent for the electrospinning solution would limit the hydrolytic degradation of PLA in the presence of nBG and increase the fiber and pore size of the material. Finer nBG would allow better incorporation into PLA fibers and greater reactivity on their surface. Finally, nBGs based on borate, against silicate in the case of the material experimented on in this study, would further enhance reactivity.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE iii

REMERCIEMENTS iv

RÉSUMÉ vi

ABSTRACT viii

TABLE DES MATIÈRES x

LISTE DES TABLEAUX xiii

LISTE DES FIGURES xiv

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xvii

LISTE DES ANNEXES xix

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

1.1 Contexte clinique 1

1.2 Electrofilage et échafaudage cellulaire 2

1.3 Objectifs de la recherche 3

1.4 Anatomie du mémoire 4

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 5

2.1 La peau 5

2.1.1 Structure de la peau 5

2.2 La guérison des plaies 6

2.2.1 Phase inflammatoire 6

2.2.2 Phase de prolifération 8

2.2.3 Phase de remodelage 9

2.3 Diabète et ulcère diabétique 10

2.3.1 Le diabète et prévalence dans la population 10

2.3.2 L'ulcère diabétique 10

2.3.3 Altérations des mécanismes de la guérison 11

2.4 Traitements des ulcères diabétiques 13

2.4.1 Approche actuelle 13
2.5 L'électrofilage pour la guérison des plaies diabétiques 15
2.5.1 Échafaudages antioxydants et anti-inflammatoires 16
2.5.2 Échafaudages pro-angiogéniques 18
2.5.3 Échafaudages basés sur les facteurs de croissance 24
2.5.4 Échafaudages antibactériens 27

CHAPITRE 3 PREMIER MATERIAU 28
3.1 Matériaux et structure choisis 28
3.2 Développement et stratégies envisagées 29
3.2.1 Première couche 29
3.3 Expériences et résultats 33
3.3.1 Paramètres d'électrofilage du PVA hydrolysé à 89% et de l'alginate . 33
3.3.2 Résistance à l'eau 36
3.3.3 Utilisation de PVA hydrolysé à 99% 37
3.3.4 Réticulation des fibres 43
3.4 Obstacles rencontrés et abandon du matériau 44

CHAPITRE 4 SECOND MATÉRIAU 46
4.1 Structure choisie 46
4.2 Matériaux et méthodes 47
4.2.1 Matériaux 47
4.2.2 Électrofilage 47
4.2.3 Analyse thermogravimétrique 50
4.2.4 Analyse SEM 51
4.2.5 Test de traction 51
4.2.6 Prolifération et viabilités de cellules de mammifère 51
4.2.7 Essai antibactérien 55
4.2.8 Productions de facteurs proangiogéniques et quantification d'ADN par coloration PicoGreen 55
4.3 Résultats 56
4.3.1 Morphologie des nBG 56
4.3.2 Morphologie et caractéristique mécanique des fibres 57
4.3.3 Prolifération et viabilité de cellules mammifères 59
4.3.4 Quantification d'ADN et production de facteurs proangiogéniques . . 61
4.3.5 Effets antibactériens 64

CHAPITRE 5 DISCUSSION 66
5.1 Difficultés d'électrofilage du mélange de PVA et d'alginate 66
5.2 Échafaudage de PLA et de nBG 67
5.2.1 Efficacité du matériau pour les blessures diabétiques 67
5.2.2 Infiltration cellulaire et limites des essais pratiqués 68
5.2.3 Taille et composition des nanoparticules 69

CHAPITRE 6 CONCLUSION 70
6.1 Synthèse des travaux 70
6.2 Limitations de la solution proposée 70
6.3 Améliorations futures 71

RÉFÉRENCES 73

ANNEXES 89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Compositions de fibres de PVA et alginate selon différentes recherches 30
Tableau 3.2 Paramètres étudiés, les paramètres de base sont représentés en gras . 34
Tableau 4.1 Paramètres d'électrofilage du PLA 46

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Illustration du processus d'électrofilage	2
Figure 2.1	Schéma des différentes couches de la peau	6
Figure 2.2	Étapes de la guérison des plaies. (a) Inflammation. (b) Prolifération. (c) remodelage	9
Figure 2.3	Le Regranex® est un gel basés sur les PDGF et autorisé par la FDA	14
Figure 2.4	Production du PRP et du PRF	15
Figure 2.5	Possibilités de moduler la guérisons des plaies avec un échafaudage	16
Figure 2.6	Action de la DFO sur la voie Hif-1α	19
Figure 2.7	Fibres de PCL alignées et poreuses chargées avec des nanoparticules de silice mésoporeuse remplies de DMOG	20
Figure 2.8	Pertes de poids du verre 13-93B3 comparé à son équivalent à base de silicate	22
Figure 2.9	Structure de la matrice PVA-BG, image obtenue par microscopie électronique à balayage	23
Figure 2.10	Produits basés sur des BG et approuvés par des organismes de régulation, Mirragen (à gauche) et Dermfactor (à droite)	24
Figure 2.11	Synthèse du matériau chargé en gentamicine (GS) et en rhEGF	25
Figure 2.12	PRF lyophilisé puis mis sous forme de granule	26
Figure 3.1	Schéma de la structure dans une plaie	28
Figure 3.2	Structure du chitosane avec le monomère déacétylé (à gauche) et acétylé (à droite)	29
Figure 3.3	Images de fibres de PVA et SA obtenues au MEB	31
Figure 3.4	(A) Structure du PVA partiellement hydrolysé, (B) structure du PVA complètement hydrolysé	32
Figure 3.5	Mécanisme de réticulation du PVA avec du glutaraldéhyde (GA)	32
Figure 3.6	Structure du PVA réticulé à l'acide citrique	33
Figure 3.7	Effets de la tension sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate	35
Figure 3.8	Effets du débit sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate	36
Figure 3.9	Effets de la distance d'électrofilage sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate	37
Figure 3.10	Effets du ratio massique PVA :SA sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate	38

Figure 3.11 Effets de la tension à sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate à une distance de 7cm 39
Figure 3.13 Itérations du montage de dissolution du PVA 39
Figure 3.12 Immersion des fibres (en blanc, à gauche) dans du PBS et résultat après quelques seconde d'immersion (à droite) 40
Figure 3.14 Image SEM des fibres de PVA hydrolysé à 99% et d'alginate. Les zones couvertes de fibres sont en gris, les zones où les fibres ont été détruites par des goutelettes sont en noir 42
Figure 3.15 Structure moléculaire de l'acide citrique 43
Figure 4.1 Amas de nanoparticules de verre dans des fibres de PLA après un mélange de 10 minutes 49
Figure 4.2 Placement de l'échantillon au repos avant un test de traction sur le testeur mécanique Mach1 V500 52
Figure 4.3 Images SEM d'un amas de nBG 56
Figure 4.4 Taille des fibres produites 57
Figure 4.5 Images SEM de fibres de PLA (à gauche) et de PLA-nBG (à droite) . 58
Figure 4.6 Test de traction du PLA (à gauche) et du PLA-nBG (à droite) 58
Figure 4.7 Comparaison des courbes de traction des fibres de PLA et de PLA-nBG 59
Figure 4.8 Fluorescence mesurée après 1, 3 et 7 jours de culture après une coloration PrestoBlue (* signifie que $p<0.05$). Expériences réalisées en triplicata 59
Figure 4.9 Contrôles du test LIVE/DEAD observés à l'aide du microscope à fluorescence EVOS M5000, les cellules vivantes sont en vert, et les cellules mortes sont en rouge 60
Figure 4.10 Imagerie des cellules sur les échafaudages de PLA et PLA-nBG à l'aide de la coloration LIVE/DEAD (projections sur l'axe Z) 62
Figure 4.11 Courbe standard obtenue à partir des standards d'ADN 63
Figure 4.12 Masse d'ADN obtenue sur les échafaudages de PLA et PLA-nBG. Expérience réalisée en duplicata 63
Figure 4.13 Concentrations en facteurs de croissance proangiogéniques après 7 jours de culture. Expérience réalisée en duplicata 64
Figure 4.14 Pétris ensemencés avec des dillution x1000 des suspension de bactéries de PLA (à gauche) et PLA-nBG (à droite) 65
Figure A.1 Effet du débit d'électrofilage sur le diamètre des fibres de PVA électrolysé à 99% et d'alginate 89

Figure A.2 Effet de la distance sur le diamètre des fibres de PVA hydrolysé à 99% et d'alginate 90
Figure A.3 Gel d'acide alginique formé lors de l'ajout de 5%(w/v) d'acide citrique à la solution d'électrofilage de PVA et d'alginate 91
Figure A.4 taille des fibres de PLA comparé aux fibres de PLA-5%n-BG (temps de mélange court) 91
Figure A.5 analyse TGA des fibres de PLA et de nBG après différentes méthode de préparation de la solution d'électrofilage 92

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AGE	Produits de Glycation Avancés (*Advanced Glycation End-Products*)
bFGF	Facteurs de Croissance des Fibroblastes Basique (*basic fibroblastes growth factors*)
BG	Verre Bioactif (*Bioactive Glass*)
CA	Acide Citrique (*Citric Acid*)
CFU	Unités Formatrice de Colonie (*Colony Forming Unit*)
DFO	Desferroxamine
DFU	Ulcère du pied diabétique (*Diabetic Foot Ulcer*)
DMOG	Dimethyloxalylglycine
DOX	Doxicycline
DPBS	Tampon Phosphate de Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*)
DW	Blessures Diabétiques (*Diabetic wounds*)
EGF	Facteurs de Croissance Épidermique (*Epidermal Growth Factor*)
FBF-2	Facteurs de Croissance des Fibroblastes 2 (*Fibroblast Growth Factor 2*)
FBS	Sérum Fœtal bovin (*Fetal Bovine Serum*)
GA	Glutaraldéhyde
HIF	Facteurs Induits par l'Hypoxie (*Hypoxia-inducible Factors*)
HIF-1	Facteurs Induits par l'Hypoxie 1 (*Hypoxia-Inducible Factor 1*)
IL-1β	interleukine 1-β
IL-6	Interleukine 6
KGF	Facteurs de Croissance des Kératinocytes (*Keratinocytes Growth Factor*)
LB	Milieu Luria-Bertani
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MEM-α	Milieu de Culture Essentiel Alpha (*Minimum Essential Culture Medium Alpha*)
MMP	Métalloprotéinases Matricielles (*Matrix Metalloproteinases*)
NB	Milieu Neutralisant (*Neutralizing Broth*)
nBG	Nanoparticules de Verre Bioactif (Bioactive Glass Nanoparticles)
NP	Neuropathies Périphériques
PBS	Tampon Phosphate Salin (*Phosphate Buffered Saline*)

PDGF	Facteurs de Croissance Dérivés des Plaquettes (*Platelet Derived Growth Factor*)
Pen-Strep	Pénicilline-Streptomycine
PKC	Protéine Kinase C
PLA	Acide Polylactique (*Poly (Lactic Acid)*)
PLGF	Facteur de Croissance Placentaire (*Placenta Growing Factor*)
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
PRF	Plasma Riche en Fibrine
PVA	Alcool Polyvinylique (*Poly (Vinyl Alcohol)*)
RFU	Unités de Fluorescence Relatives (*Relative Fluorescence Units*)
ROS	Espèces Réactives d'Oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
SEM	Microscope Electronique à Balayage (*Scanning Electron Microscope*)
T-β4	Thymmosine Beta 4
TFE	2,2,2-Trifluoroéthanol
TGA	Analyse Thermogravimétrique (Themogravimetric Analysis)
TGF-α	Facteurs de Croissance Transformants Alpha (*Transforming Growth Factor Alpha*)
TNF-α	Facteurs de Nécrose Tumorale Alpha (*Tumour Necrosis Growth Factor Alpha*)
VEGF	Facteurs de Croissance de L'Endothélium Vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factors*)
VEGF-A	Facteurs de Croissance de l'Endothélium Cellulaire A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*)
ZnO	Nanoparticules d'Oxyde de Zinc (*Zinc Oxyde Nanoparticles*)

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Résultats supplémentaires 89

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte clinique

Le diabète est une maladie chronique qui se traduit en une diminution de la production ou l'efficacité d'insuline, hormone permettant de diminuer le taux de glucose dans le sang dans l'homéostasie glycémique. Les patients en souffrant sont donc souvent dans un état d'hyperglycémie, une haute concentration de glucose dans le sang. Cette concentration a des influences variées sur le corps humain à plusieurs niveaux. Les patients diabétiques sont par exemple plus à risque de développer des maladies cardiaques ou rénales [1].

Parmi les complications possibles, les plaies chroniques font partie des pires. Les patients diabétiques sont souvent atteints de neuropathie, des dommages nerveux impliquant des pertes de sensations dans certaines parties du corps, et de maladies vasculaires périphériques, qui impliquent un débit sanguin plus faible dans certaines zones du corps. Ce mélange de symptômes peut être à l'origine de plaies, dont le patient ne remarque pas la présence à temps à cause de la perte de sensation, et qui ne peuvent pas guérir correctement à cause, entre autres, du faible débit sanguin. Ces plaies restent donc ouvertes durant de longues périodes (plus de 4 à 6 semaines pour être qualifiée de plaie chronique) et peuvent s'infecter. Si l'infection progresse trop et atteint l'os, alors l'amputation devient inévitable. Les membres inférieurs sont les plus touchés et contribuent à une grande partie des amputations non traumatiques, les patients diabétiques étant 20 fois plus à risque que les patients n'ayant pas cette maladie [2].

Ces plaies appelées ulcères diabétiques sont à l'origine de pertes d'argent et de qualité de vie significatives pour le système de santé et les patients. La majorité des méthodes actuelles consistent en un soin régulier de la plaie par l'application de bandages ayant pour but de favoriser la guérison de la plaie en fournissant un environnement adéquat. Soit un environnement humide, capable d'absorber des exsudats de la plaie, qui laisse passer l'oxygène venant de l'extérieur du corps, et qui limite l'accès aux microorganismes extérieurs.

Même si dans la majorité des plaies des patients sains, ces conditions suffisent, les patients diabétiques souffrent en plus de problèmes liés à l'hyperglycémie et qui limitent la guérison de la plaie. Cette dernière reste donc dans un stade inflammatoire chronique et ne reconstruit pas de nouveaux tissus pour remplacer ceux qui sont abîmés. Cela participe en grande partie à la longue durée de vie de ces plaies. Les traitements actuels sont donc rarement suffisants ou efficaces. Le système de santé a donc besoin de traitements qui assurent des conditions

propices à la cicatrisation, mais qui agissent aussi sur le comportement des cellules autour de la plaie pour les motiver à retrouver leurs fonctions.

1.2 Electrofilage et échafaudage cellulaire

L'électrofilage est une méthode de production de fibres inventée au début du 20e siècle, mais dont l'intérêt en recherche scientifique connaît une croissance exponentielle depuis 1995 [3]. Cette méthode permet de produire des fibres de polymère allant de 100 nm à quelques µm de diamètre.

Cette méthode fonctionne selon le principe suivant (décrit sur la figure 1.1) : un polymère dissous dans un solvant est contenu dans une seringue. Cette seringue a une aiguille métallique, dont l'extrémité est située à une distance précise d'un collecteur métallique. Une différence de tension à l'échelle de quelques dizaines de kilovolts est imposée entre l'aiguille et le collecteur. La solution de polymère est poussée à travers l'aiguille, et les charges s'accumulent à la surface de la goutte de solution formée au bout de l'aiguille. Lorsque la force électrostatique devient plus forte que la tension de surface de la solution, le ménisque se déforme en un cône appelé cône de Taylor. Ce cône s'allongeant, le solvant s'évapore, laissant uniquement les molécules de polymères entrelacées qui rejoignent le collecteur, formant une fibre.

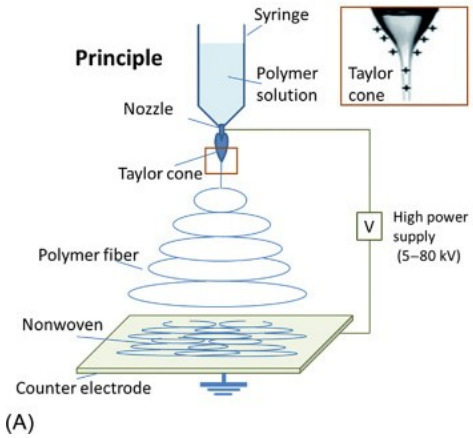


FIGURE 1.1 Illustration du processus d'électrofilage [4]

L'électrofilage possède de nombreux paramètres qu'il est possible d'influencer :

- Le polymère en solution (composition, poids moléculaire, concentration)
- La composition du solvant (nature du solvant, co-solvant, ajouts de surfactant, nanoparticules, molécules bioactives, etc.)
- Le débit d'injection de la solution au travers de l'aiguille

— La distance entre le bout de l'aiguille et le collecteur de fibres
— La différence de tension appliquée entre l'aiguille et le collecteur

Cette technique a attiré beaucoup d'intérêt pour la production d'échafaudage cellulaires en génie tissulaire durant la dernière vingtaine d'année à cause de plusieurs facteurs :

— La porosité élevée d'un matelas de fibres et la structure de ce dernier imite celle de la matrice extra-cellulaire (MEC). Cela lui permet de servir d'échafaudage dont la structure ressemble fortement à l'environnement des cellules du corps humain.
— Les fibres présentent un ratio surface : volume très élevé, ce qui facilite l'adhérence et la prolifération cellulaire, mais aussi les interactions entre l'échafaudage et les cellules.
— La taille des pores et la taille des fibres d'un matériau électrofilé est ajustable, ce qui permet d'adapter la structure de l'échafaudage à la zone du corps où il va être posé.
— Il est possible d'incorporer des molécules bioactives à l'échafaudage cellulaire. Combiné au contrôle précis de l'architecture des fibres, l'échafaudage devient donc un moyen de délivrance contrôlé de médicaments.
— La grande variété de polymères électrofilables, d'origine naturelle ou synthétique, permet d'adapter la structure aux besoins mécaniques de régions variées du corps.

C'est un moyen de délivrance de médicaments très efficace grâce à la grande surface de contact des fibres électrofilées.

Dans le cadre de plaies diabétiques, les fibres électrofilées peuvent avoir des fonctions multiples : remplacer les tissus manquants et donner un tissu de soutien pour la prolifération des cellules de la plaie, moduler le comportement de ces cellules à l'aide de médicaments ou de matériaux bioactifs, protéger la plaie des bactéries tout en la gardant aérée. Ces fibres ont donc attiré beaucoup d'intérêt dans le domaine de la guérison des plaies depuis un peu plus d'une dizaine d'années.

1.3 Objectifs de la recherche

L'objectif général de cette recherche était de développer une structure électrofilée capable d'accélérer la guérison d'une plaie diabétique en fournissant un support aux cellules de la plaie et en modulant leur comportement à l'aide de matériaux bioactifs ou de substances médicamenteuses. Il convient donc de faire une revue de la littérature afin de mieux comprendre les besoins des plaies diabétiques et les solutions efficaces en pratique pour en tirer une stratégie adéquate. Ensuite, un choix de matériaux, de structure, et de substances sera basé sur cette stratégie. Ces matériaux seront ensuite électrofilés en un échafaudage qui sera caractérisé mécaniquement, chimiquement et biologiquement afin de vérifier son intérêt en tant qu'échafaudage cellulaire dans une plaie diabétique.

Les objectifs sont donc les suivants :

- Faire une revue de littérature concernant les besoins des plaies diabétiques et les solutions développées en pratique, notamment à l'aide de l'électrofilage
- Faire un choix de matériau et de structure répondant aux besoins d'une plaie diabétique et le produire par électrofilage.
- Caractériser ce matériau mécaniquement, chimiquement, et biologiquement

1.4 Anatomie du mémoire

Dans le chapitre 2, nous reverrons la littérature concernant la problématique dégagée.

Dans le chapitre 3, le premier choix de matériaux et de structures sera abordé, les motivations derrière ce choix seront expliquées. Les expériences réalisées, les problèmes rencontrés ainsi que les raisons menant à son abandon seront ensuite abordés.

Dans le chapitre 4, le second matériau utilisé après l'échec du premier sera expliqué. Les méthodes utilisées pour le caractériser et les résultats obtenus seront abordés.

Dans le chapitre 5 les résultats obtenus lors des chapitres 3 et 4 seront abordés lors d'une discussion.

Dans le chapitre 6, nous conclurons le mémoire en synthétisant la discussion. Les limites de la solution proposée seront abordées et des recommandations pour la production de futurs échafaudages cellulaires électrofilés.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Cette section consiste en une revue exhaustive de la littérature sur la guérison des plaies diabétiques, elle sera partagée en plusieurs sections.

Premièrement la structure DE la peau ainsi que le mécanisme de sa guérison en cas de plaie seront abordés. Deuxièmement, la prévalence du diabète et l'impact de ce dernier sur la guérison des plaies seront expliqués. Troisièmement, les possibilités de traitements existants et les nouvelles approches avec leurs intérêts et limitations seront abordées. Finalement, l'électrofilage, son fonctionnement ainsi que les utilisations qui en ont été faits pour la guérison des plaies diabétiques seront abordés.

2.1 La peau

2.1.1 Structure de la peau

La peau est le plus grand organe du corps humain, pesant plus de 3 kilos et avec une surface de $2m^2$ chez l'adulte. Sa fonction est de protéger le corps de l'environnement extérieur (agressions, bactéries...), mais aussi d'assurer l'homéostasie et empêcher l'eau de s'échapper de notre corps. Elle est répartie en plusieurs couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Dans les prochains paragraphes, la composition de chaque partie sera expliquée basée sur celle donnée par [5].

L'épiderme est la couche extérieure et est mince (de 0,5 à 1,5 mm selon l'emplacement du corps). Elle est majoritairement constituée de kératinocytes. Des cellules de Langerhans sont présentes ainsi que des mélanocytes et des cellules-souches, entre autres. Les cellules-souches sont au plus profond de l'épiderme et les cellules-filles (les kératinocytes) migrent vers l'extérieur et forment progressivement un épithélium pavimenteux kératinisé. Les kératinocytes deviennent des cornéocytes, des cellules mortes anucléées qui sont progressivement éliminées sous forme de peaux mortes. Cette couche est donc en régénération perpétuelle et se renouvelle complètement environ tous les 2 mois. Elle fournit une barrière imperméable entre l'intérieur et l'extérieur du corps.

Le derme est la couche intermédiaire de la peau, elle contient une majorité de tissus conjonctifs composée de collagène et d'élastine. Cette MEC est synthétisée par les fibroblastes, présents en masse dans cette région, et est en régénération constante. On y trouve aussi des mastocytes capables de sécréter de l'histamine et d'autres cytokines. Le derme est vascularisé pour soutenir la régénération de l'épiderme et est donc traversé par de nombreux capillaires. Cette

couche est aussi innervée.

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau, elle est d'épaisseur variable et contient en majorité des adipocytes. Ces adipocytes servent de réserve d'énergie aux autres couches et sont un lubrifiant naturel qui permet d'éviter que les mouvements à la surface de la peau se répercutent sur les structures sous-jacentes. Cette couche a aussi des propriétés endocrines grâce à ces mêmes cellules.

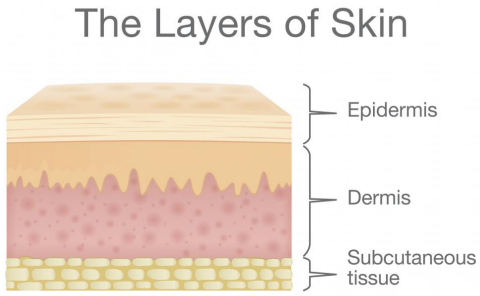


FIGURE 2.1 Schéma des différentes couches de la peau

2.2 La guérison des plaies

L'ouverture d'une plaie implique la perte de liquide nécessaire au fonctionnement du corps (hémorragie) et la perte de protection contre les organismes extérieurs (infections). Ces problèmes étant critiques, le mécanisme de la guérison des plaies a pour but de fermer le plus rapidement possible la plaie afin de restaurer cette barrière entre l'intérieur et l'extérieur du corps.

Il est classiquement considéré que le processus de guérison des plaies possède 3 étapes : l'inflammation, la prolifération et le remodelage. Ces étapes ne sont pas strictement exclusives et peuvent donc se chevaucher, mais suivent généralement un ordre [6]. Ces étapes sont aussi détaillées sur la figure 2.2. Chacune de ces phases est distinguée par la migration et la prolifération de certains types cellulaires, et par la production de certaines molécules, comme des facteurs de croissance ou des facteurs pro-inflammatoires.

2.2.1 Phase inflammatoire

La première étape est l'inflammation. Après l'ouverture d'une blessure, les tissus sont abîmés et la protection du corps par la peau n'est plus assurée. Il y a aussi une perte de fluide et de

sang qui doit être limitée. Les plaquettes forment rapidement un bouchon qui limite la perte de sang. Les plaquettes relâchent des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) et des facteurs de croissance transformants alpha (TGF-α). Ces molécules servent de facteurs de croissance pour les cellules entourant la plaie et de chimioattractants pour les cellules du système immunitaire [7]. Ce bouchon est ensuite infiltré par une matrice de fibrine qui permet aux cellules d'infiltrer la plaie. Des cellules immunitaires sont recrutées par le biais du complément ou de la dégranulation des plaquettes. Les neutrophiles sont les premiers à être présents, suivis des monocytes qui se différencient en macrophages à proximité de la plaie. Les macrophages ont aussi la fonction d'efferocytose, qui consiste en l'élimination des cellules apoptotiques dans l'environnement de la plaie. Les neutrophiles produisent des protéases, des espèces réactives d'oxygène (ROS) et des peptides antimicrobiens qui vont détruire les bactéries présentes dans la plaie et les tissus abîmés. Ils utilisent de plus le processus de nétose qui permet le largage de chromatine décondensée et d'ADN dans le milieu extracellulaire comme piège pour les bactéries. Des médiateurs pro-inflammatoires sont aussi excrétés et ont pour effet de recruter plus de cellules du système immunitaire dans les alentours de la plaie.

Les macrophages présents présentent différents phénotypes selon que la plaie se trouve au début ou à la fin de la phase d'inflammation. Au début de la phase, les macrophages présentent un phénotype M1, pro-inflammatoire. Les macrophages produisent alors des facteurs de nécrose tumorale alpha (TNF-α), des interleukine 1 beta (IL-1β) et interleukine 6 (IL-6) qui ont des effets bactéricides. De plus, des métalloprotéinases matricielles (MMP) sont produits afin de dégrader en partie la MEC de la plaie, pour détruire les tissus abîmés [8]. Dans un second temps, les macrophages commencent à présenter le phénotype M2, anti-inflammatoire. Les macrophages produisent alors des facteurs de croissance divers, tels que les facteurs de croissance des fibroblastes basique (bFGF) qui vont commencer à motiver la migration et la prolifération des fibroblastes afin d'amorcer la phase de prolifération. Les types M1 et M2 existent de façon simultanée, le ratio M1/M2 étant en faveur des M1 en début d'inflammation et en faveur des M2 à la fin de celle-ci. Un équilibre est toujours gardé pour empêcher une inflammation excessive.

Les protéases et les ROS produits par les neutrophiles ont aussi des effets collatéraux et provoquent des dommages aux tissus sains environnants. Ces dommages provoquant le recrutement de plus de cellules immunitaires à cause de cascades de signalisation, ce qui crée une boucle de rétroaction positive pour l'inflammation. Ces neutrophiles entrent donc en apoptose à la fin de la phase inflammatoire et sont ensuite détruits par les macrophages pour éviter une inflammation excessive [9].

L'inflammation est donc un processus utile pour protéger la plaie d'envahisseurs extérieurs,

mais est aussi destructrice pour les tissus sains. L'équilibre entre destruction et construction est fragile e l'inflammation doit se résoudre rapidement pour que la plaie puisse guérir.

2.2.2 Phase de prolifération

La seconde étape est la prolifération, dure entre quelques jours et plus d'une semaine, et est caractérisée par la prolifération et la migration de nombreux types de cellules dans la plaie. Ce processus inclut la réépithélialisation et la formation du tissu de granulation.

Répondant à la production de facteurs de croissance des kératinocytes (KGF) et de facteurs de croissance épidermique (EGF), les kératinocytes en bordure de la plaie migrent à la surface du derme abîmé et commencent à reformer l'épiderme dans un processus nommé réépithélialisation. Les kératinocytes prolifèrent et détruisent leurs points d'ancrage à leur membrane basale pour faire ce déplacement. Elles sécrètent aussi des MMP pour pouvoir dégrader le collagène de leur membrane basale et migrer dans la plaie.

La migration et la prolifération des kératinocytes sont soutenues par le tissu de granulation, un remplacement à la matrice de fibrine qui est constitué de fibroblastes, de macrophages et de nombreux nouveaux vaisseaux sanguins. Les fibroblastes créent une MEC provisoire constituée de collagène de type III, de fibronectine et d'autres glycoprotéines. Une partie des fibroblastes se différencie en myofibroblastes, des fibroblastes ayant une capacité contractile qui leur permet d'aider à fermer la plaie vers la fin du processus de cicatrisation [6].

Les cellules endothéliales répondent à la production de facteurs de croissance proangiogéniques produits par les fibroblastes, les macrophages, les kératinocytes et les cellules du tissu adipeux sous-cutané [8]. Une grande partie de ces facteurs sont des facteurs induits par l'hypoxie (HIF), dont l'expression est provoquée par l'hypoxie au sein de la plaie. Parmi ces facteurs on retrouve les VEGF, les PDGF, les TGF-α, les bFGF ou les angiopoïétines, entre autres. Les cellules endothéliales réagissent en se dissociant des vaisseaux sanguins puis en migrant, formant de nouveaux capillaires sanguins en suivant notamment le gradient de VEGF. Parmi les différents types de VEGF, le facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A) est le plus puissant et le plus largement produit par les cellules dans une plaie [10].

La phase de prolifération est donc un effort collectif d'une grande variété de cellules différentes, qui communiquent ensemble par la production de nombreux facteurs de croissance. La guérison des plaies est donc un processus complexe qui nécessite une étroite collaboration et une coordination entre un grand nombre de cellules qui communiquent entre elles en utilisant un grand nombre de cytokines différentes.

2.2.3 Phase de remodelage

La phase de remodelage commence environ 3 semaines après l'ouverture de la plaie. La majorité des cellules dans le tissu cicatriciel entrent en apoptose ou quittent le lieu de la plaie. Les fibroblastes vont peu à peu remplacer le collagène de type III par du collagène de type I qui sera le matériau définitif présent dans la plaie. Ce processus prend en général plusieurs mois.

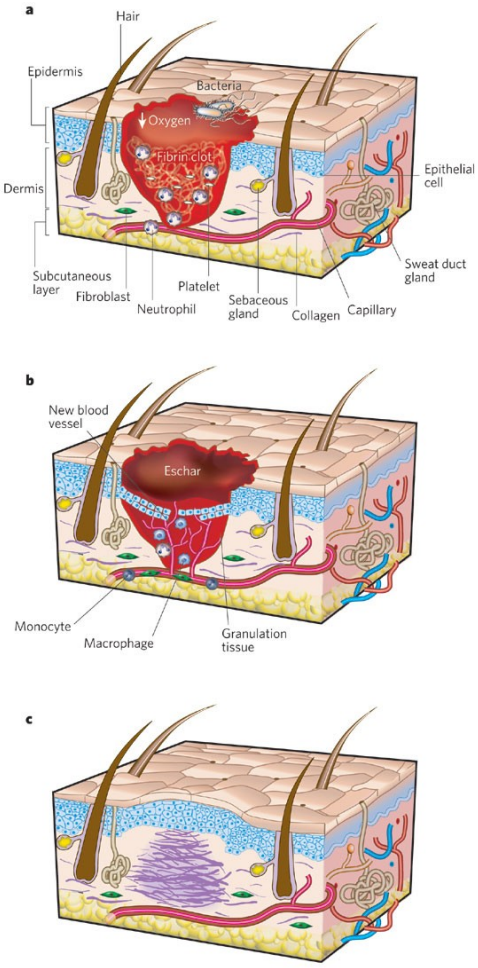


FIGURE 2.2 Étapes de la guérison des plaies. (a) Inflammation. (b) Prolifération. (c) remodelage [6]

2.3 Diabète et ulcère diabétique

2.3.1 Le diabète et prévalence dans la population

Le diabète est une maladie touchant l'homéostasie de la glycémie et empêche de réduire la concentration de sucre dans le sang, les patients souffrent donc d'hyperglycémie chronique. Il est réparti en deux types : le type 1 est une maladie auto-immune, le système immunitaire du patient détruit les cellules bêta, responsables de la production d'insuline dans le foie. Ces patients ne produisent donc pas d'insuline, mais peuvent s'en injecter afin de diminuer le taux de sucre dans leur sang ; le type 2 est causé par une résistance aux effets de l'insuline, ce qui implique une hyperglycémie chronique. Cette maladie étant circulatoire, il est estimé qu'elle contribue à d'autres maladies. Il est estimé que le diabète contribue à 30% des accidents vasculaires cérébraux, 40% des attaques cardiaques et 50% des insuffisances rénales requérant une dialyse [11].

En 2011, la population atteinte par le diabète au niveau mondial était estimée à 366 millions, mais il est attendu que le demi-milliard soit dépassé en 2030 [12]. Il est important de noter que les projections réalisées dans le passé ont souvent été en dessous de la réalité. Cette augmentation serait due à l'augmentation de la sédentarisation, du surpoids dans la population et de la diminution de la qualité de l'alimentation entre autres.

Selon un rapport de Diabète Canada [1], près de 14% de la population canadienne est touchée par le diabète en 2022. En comptant les personnes prédiabétiques, ce chiffre atteint 30%. Toujours selon ce rapport, l'augmentation du nombre de patients diagnostiqués aura augmenté de plus de 25% d'ici 2032. La maladie occasionne des coûts importants pour le système de santé, mais aussi pour les patients, qui payent en moyenne 1500$ de leur poche chaque année pour couvrir leurs frais de santé.

2.3.2 L'ulcère diabétique

Les personnes diabétiques souffrent de plaies chroniques. La phase d'inflammation est alors très longue et ne permet pas à la phase de prolifération de débuter, empêchant la fermeture de la plaie. Ces plaies restent donc ouvertes pendant plusieurs mois, voire plus d'un an. Ce sont donc des ouvertures à des infections bactériennes répétées et de plus en plus graves jusqu'à finalement nécessiter une amputation.

Ces ulcères diabétiques se développent la majorité du temps sur les pieds des personnes diabétiques, et le phénomène est tel que le terme ulcère du pied diabétique (DFU) est utilisé de façon interchangeable pour parler des plaies diabétiques en général. Les patients diabétiques

génèrent souvent par la marche des irritations répétées qui ne sont pas remarquées à temps. À terme, le manque de prévention et de soins aboutit à l'ouverture d'une plaie diabétique, qui peut devenir chronique, soit rester ouverte pour de longs laps de temps [13].

Les personnes diabétiques souffrent souvent de neuropathies périphériques, plus de 50% des patients diagnostiqués depuis plus de 25 ans sont atteints [14]. Ces neuropathies engendrent des pertes de sensation, et donc des difficultés pour remarquer la présence d'irritations ou de blessures. Les patients ont des difficultés à prévenir ces plaies et aussi à en prendre soin avant qu'elles s'enveniment. Les personnes diabétiques souffrent aussi souvent d'angiopathies périphériques, qui diminuent la perfusion sanguine dans ces régions et donc la capacité de guérison [15].

Il est estimé que 15 à 25% des diabétiques souffriront d'un ulcère au cours de leur vie [16] et que 80% des amputations de membres inférieurs liées au diabète sont nécessaires à la suite d'un DFU [17]. Les personnes diabétiques sont 20 fois plus à risque de nécessiter une hospitalisation à la suite d'une amputation d'un membre inférieur que les patients sains [2]. De 2011 à 2012, un tiers des amputations rapportées au Canada étaient pratiquées sur des patients atteints par des DFU. Le coût des DFU aux États-Unis chaque année était estimé à 6 milliards de dollars en 2006 [18].

2.3.3 Altérations des mécanismes de la guérison

L'hyperglycémie altère le fonctionnement des cellules de différentes façons. La haute concentration en glucose affecte la régulation de différentes voies de signalisation cellulaires, notamment celle de la protéine kinase C (PKC), qui concerne un grand nombre de cascades de signalisation cellulaire. La production de produits de glycation avancés (AGE) des protéines, lipides, etc., qui sont modifiés de manière permanente sans action enzymatique, est bien plus importante. L'augmentation de concentration en glucose suffit à provoquer ces réactions. Certaines molécules deviennent donc incapables de servir leurs fonctions, ce qui altère l'expression d'autres molécules, notamment les facteurs pro ou anti-inflammatoires [19].

Phase inflammatoire

Au début de la phase inflammatoire, les neutrophiles arrivent en grand nombre pour assurer la défense contre les bactéries dans la plaie et détruire les tissus abîmés pour qu'ils puissent être remplacés. Dans le cadre d'une plaie diabétique, les neutrophiles montrent des effets bactéricides plus faibles et une chimiotaxie plus faible. La production de radicaux est plus élevée que chez des patients sains [20]. Le relargage de produits cytotoxiques est bien plus important

(ROS, protéases, etc.), notamment à cause de la nétose exacerbée. Les effets bactéricides sont donc plus faibles et les dommages collatéraux aux tissus sains environnants [9, 21].

L'équilibre M1/M2 chez les macrophages est aussi affecté. Il est hyperpolarisé vers les M1 au début de la phase inflammatoire et pauvre en M2 par la suite. Le nombre des macrophages est plus faible et leur capacité d'efferocytose est donc réduite, augmentant le fardeau de cellules apoptotiques dans la plaie [22]. La production de TNF-α est supérieure à la normale et réduit la prolifération des fibroblastes tout en induisant leur apoptose [23]. Les TNF-α et les IL-1β étant synergiques, la production de IL-1β étant induite par les TNF-α, la production de IL-1β est aussi plus intense [24] . Ces deux facteurs pro-inflammatoires augmentent la production de MMP, qui atteignent jusqu'à 60 fois leur concentration normale [25].

Les capacités bactéricides du système immunitaire sont donc plus limitées, les cellules apoptotiques ne sont pas éliminées suffisamment vite. La destruction des tissus sains environnants est aussi trop importante.

Phase de prolifération

Les fibroblastes et les kératinocytes d'une plaie diabétique montrent une migration et une prolifération plus faible que dans une plaie saine. Cela peut être attribué à la production plus faible de EGF, de facteurs de croissance de fibroblastes, de TGF-α et de PDGF [26, 27]. En plus de ce manque de facteurs de croissance, les fibroblastes et kératinocytes réagissent peu à ces derniers. Les fibroblastes ont une morphologie différente, plus large et étendue que la forme longue et fine normale. Leur structure interne est modifiée, avec un réticulum endoplasmique plus dilaté et un manque de structure microtubulaire [26]. Les récepteurs de l'EGF de la membrane des kératinocytes sont anormalement placés et un défaut de prolifération qui les empêche de se reproduire [7, 28].

L'angiogenèse est aussi dysfonctionnelle dans cette phase. La production de facteurs de croissance proangiogénique et la présence des récepteurs associés au sein de la plaie sont plus faibles [29]. Les progéniteurs des cellules endothéliales dans la circulation sanguine sont présents en plus faibles quantités et ont aussi moins de capacité à former de nouveaux vaisseaux sanguins [30]. Le tissu de granulation a donc beaucoup de difficultés à se former à cause du manque de prolifération et de migration cellulaire, mais aussi à cause du manque de nutriments et d'oxygène nécessaires, ce qui diminue la capacité de migration et de prolifération des cellules. L'hypoxie constante ajoute au stress oxydatif déjà présent dans la plaie, car la production d'antioxydants est dépendante de l'alimentation en oxygène.

La phase de prolifération d'une plaie diabétique est caractérisée par un immobilisme des

cellules sensées reconstruire des tissus sains et fermer au plus vite la plaie. Cet immobilisme est dû à une diminution de la production de facteurs de croissance et à l'augmentation de la production de facteurs pro-inflammatoires. La capacité des différentes cellules à répondre aux stimuli est aussi impactée. L'angiogenèse est aussi défaillante. Ces problèmes s'alimentent les uns les autres au travers de diverses boucles de rétroaction.

2.4 Traitements des ulcères diabétiques

La meilleure méthode pour traiter les ulcères diabétiques est de les prévenir. Il est conseillé aux patients diabétiques de régulièrement vérifier l'état de leurs pieds pour détecter la formation d'irritation ou de corne et de les traiter en amont. Une bonne hygiène et des chaussures adaptées, avec l'utilisation d'orthèses plantaires en cas de défaut de marche, sont aussi conseillées. Malgré ces mesures, les ulcères diabétiques sont tout de même communs, et présentent un haut taux de récurrence de près de 40% à 1 an et de plus de 60% à 5 ans [31]. Les ulcères diabétiques seront donc toujours un poids pour le système de santé. Différentes méthodes sont donc utilisées pour gérer ces plaies.

2.4.1 Approche actuelle

Les soins apportés à une plaie diabétique commencent par la diminution de la charge sur le lieu des ulcères, par l'application d'une orthèse et l'élimination de la corne présente sur les pieds du patient. Le traitement de l'hyperglycémie passe souvent par la nutrition ou l'utilisation d'insuline. Le débridement des tissus morts ou infectés suit, afin de retirer le fardeau bactérien et nécrotique dans la plaie. Un pansement est ensuite appliqué. Ce pansement sert de barrière contre les bactéries, il doit permettre l'aération de la plaie, une humidité adéquate et absorber les exsudats [32].

Lorsque la plaie ne se ferme pas après environ 4 à 6 semaines de soin classiques, d'autres méthodes peuvent être utilisées pour traiter la plaie. Nous allons d'abord traiter les options existantes avant de traiter les différentes recherches menées jusqu'ici.

Facteurs de croissance

Un seul produit contenant des facteurs de croissance est approuvé par la FDA et Santé Canada pour le traitement des ulcères diabétiques. C'est un gel de PDGF recombinants (Becaplermin, REGRANEX® Smith & Nephew) destiné à être appliqué de façon topicale dans la plaie. Il a été démontré que l'usage de ce gel permettait de diminuer les chances d'amputation et augmente le taux de guérison des ulcères [33, 34].

Le problème des traitements par facteurs de croissance reste leur prix, lié à la production de facteurs de croissance recombinants et à leur purification. Un tube de ce gel coûte environ 600 dollars et plusieurs peuvent être requis pour mener à la fermeture d'une plaie. Les monothérapies par facteur de croissance ont plusieurs désavantages. L'environnement d'une plaie diabétique est naturellement protéolytique, diminuant la quantité de facteurs de croissance effectifs dans la plaie. L'utilisation d'un unique facteur de croissance ne répond pas à la complexité des blessures diabétiques où le manque ne concerne pas un seul, mais plusieurs facteurs de croissance [35].



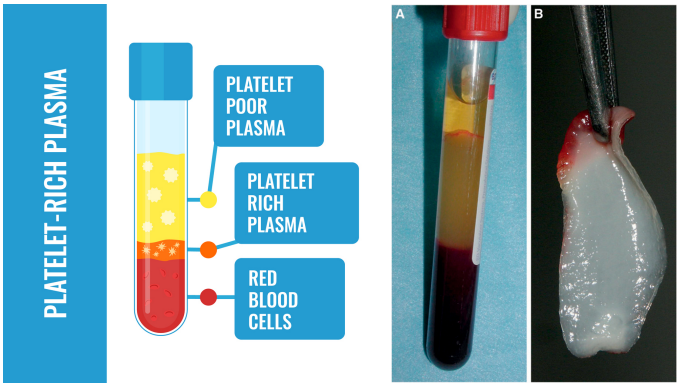
FIGURE 2.3 Le Regranex® est un gel basés sur les PDGF et autorisé par la FDA

En conséquence, les seuls traitements réguliers pour la délivrance de facteurs de croissance, en chirurgie comme pour les plaies, sont le plasma riche en plaquettes (PRP) et le plasma riche en fibrine (PRF). Ces substances sont obtenues en centrifugeant du sang en présence d'anticoagulant (PRP) ou pas (PRF), la fraction centrale du liquide obtenu est ensuite prélevée. Ces substances contiennent donc les granules α des plaquettes qui sont riches en PDGF, TGF-α, EGF et VEGF. Ces mélanges sont tirés de prélèvements autologues chez le patient [35].

Pansements cellularisés

Au lieu d'apporter des facteurs de croissance dans la plaie, certains produits misent sur le fait d'apporter des cellules saines sur un échafaudage dans celle-ci. Ces échaudages ont plusieurs avantages. Les cellules apportées dans la plaie sont saines et capables de produire des facteurs de croissance en quantité suffisante. Le pansement fait office de substitut de peau, et protège la plaie contre les bactéries le temps que la cicatrisation opère. L'échafaudage sur lequel les cellules sont ensemencées est aussi accueillant pour les cellules environnantes. Dans ces options on retrouve Apligraf® et Dermagraft® tous deux produits par Organogenesis.

Apligraf® est un échafaudage de collagène bovin couvert de deux couches de cellules : des



(a) Répartition des fractions durant la synthèse du PRP (b) Synthèse du PRF (tiré de [36])

FIGURE 2.4 Production du PRP et du PRF

kératinocytes allogéniques à sa surface et des fibroblastes allogéniques plus en profondeur. Après 12 semaines d'application hebdomadaire, Appligraf® a permis à plus de 50% des plaies de patients traités de se fermer, contre 26% des patients traités avec un contrôle dans une cohorte de 70 patients [37]. Une autre étude a montré que le temps moyen de cicatrisation d'un groupe traité était de 40 jours pour un groupe traité et de 77 jours pour un groupe contrôle [38].

Dermagraft® est un échafaudage composé de polyglactine et ensemencé avec des fibroblastes allogéniques. Une étude a montré que pour des ulcères diabétiques ayant duré plus de 6 semaines, 30% des patients traités avec Dermagraft® bénéficiaient d'une guérison complète contre seulement 18% dans un groupe contrôle [39].

2.5 L'électrofilage pour la guérison des plaies diabétiques

Les plaies diabétiques sont caractérisées par plusieurs problèmes majeurs. Le stress oxydatif qui détruit les tissus et réduit l'effet des facteurs de croissance, le manque d'angiogenèse et de prolifération des différents types cellulaires, le manque de facteurs de croissance, et enfin le fardeau bactérien présent dans la plaie. Les types d'approches utilisées par électrofilage visent en général ce type d'application.

Nous avons déjà mentionné au chapitre 1 l'intérêt de l'électrofilage pour la guérison des plaies, saines ou diabétiques. De nombreux articles traitent de structures électrofilées utilisées dans le cadre de plaies chroniques ou diabétiques [40]. Dans cette section, nous allons revoir les matériaux électrofilés utilisés dans le cadre des plaies diabétiques. L'approche idéale pour les DFU étant à une approche à plusieurs volets, certaines recherches mentionnées ici n'ap-

partiennent pas exclusivement à une seule catégorie, cette séparation est utilisée à fin de simplifier nos explications.

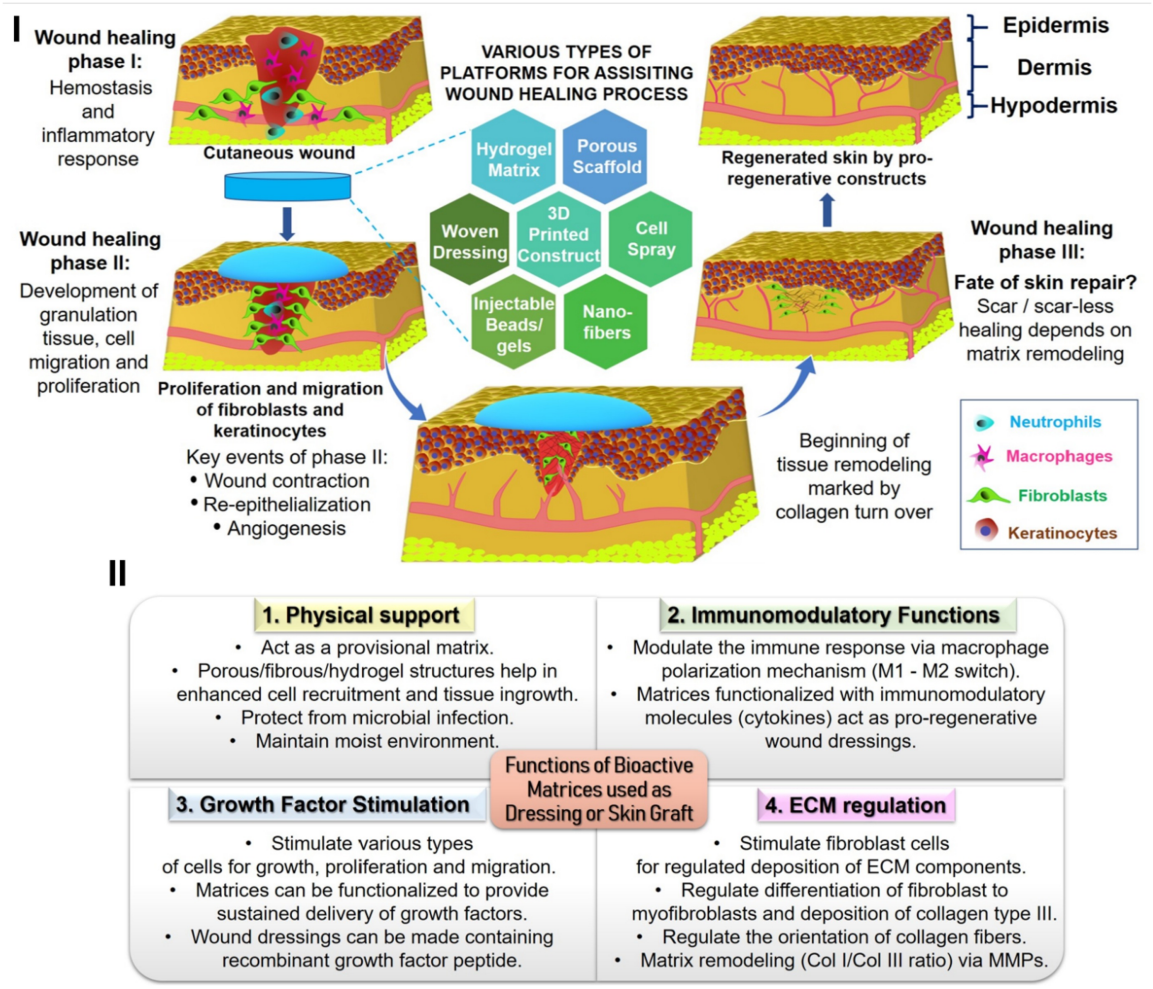


FIGURE 2.5 Possibilités de moduler la guérisons des plaies avec un échafaudage [41]

2.5.1 Échafaudages antioxydants et anti-inflammatoires

Les plaies diabétiques sont qualifiées par un environnement oxydatif fort, dû d'une part à la production de ROS en grande quantité par le système immunitaire, et d'autre part à l'hypoxie dans les tissus. Ce stress oxydatif dégrade la MEC, retardant la formation du tissu de granulation, et crée un environnement hostile aux facteurs de croissance, notamment les facteurs de croissance proangiogéniques. L'utilisation de substances antioxydantes dans des échafaudages électrofilés permettrait de diminuer les dégâts collatéraux des ROS, et d'augmenter la durée de vie des facteurs de croissance produits dans la plaie et donc leur efficacité. Dans cette section, nous allons revoir des articles liés à l'utilisation de substances

antioxydantes dans des fibres électrofilées destinées aux plaies diabétiques.

Certaines substances naturelles, notamment utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise, ont des propriétés antioxydantes. De la curcumine et de l'extrait de Lithospermi Radix ont été électrofilés avec de la gélatine sur des échafaudages de chitosane [42]. Ces ingrédients bénéficient de propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes, alors que la gélatine, tirée de collagène, est un polymère naturel permettant un attachement simple pour les cellules humaines. Le chitosane est un matériau antibactérien et qui possède aussi des propriétés prolifératives [43]. Ce matériau a permis de fermer à 60% les blessures de rats diabétiques après 7 jours de traitement, contre moins de 50% comparés aux autres matériaux. La différence aux jours 14 et 28 devient statistiquement insignifiante, mais la fermeture plus rapide d'une plaie permet de rapidement diminuer la possibilité d'infection dans une plaie. De la curcumine a aussi été électrofilée avec du polycaprolactone, du PVA, et de la fibroïne de soie [44]. Lors du test *in vivo* sur des souris diabétiques, les plaies étaient refermées après 14 jours de traitements par des fibres contenant de la curcumine, alors que la surface des plaies traitées avec un contrôle était encore à plus de 50% de leur surface initiale.

Des nanoparticules métalliques peuvent aussi être utilisées en tant qu'antioxydant. Les nanoparticules sont aussi des agents antibactériens qui bénéficient de moins d'effets secondaires que les antibiotiques et ne sont pas concernés par l'acquisition de résistances bactériennes. La question de leur toxicité dépend d'un type de nanoparticule à l'autre et selon la quantité utilisée [45]. Des nanoparticules d'oxyde de cérium ont été électrofilées avec du Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Les nanoparticules de cérium sont connues pour avoir des propriétés antioxydantes [46], mais aussi proangiogéniques, comme il a été démontré dans l'étude citée [47]. Des tests *in vivo* ont montré que le groupe de rats diabétiques traités avec les fibres contenant des nanoparticules a obtenu une contraction de leurs blessures plus rapide qu'avec le contrôle. Les analyses histologiques montrent un tissu de granulation plus épais et plus infiltré par des capillaires sanguins [47]. Des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) ont été électrofilées avec du chitosane et du PLA, les ZnO ont des effets antioxydants et antibactériens et il a été prouvé que les nanofibres en contenant permettaient d'améliorer la prolifération et l'adhérence de fibroblastes [48]. Dans cette étude, les fibres de chitosane, PVA et de ZnO ont permis d'accélérer la fermeture des plaies de lapins diabétiques sur une période de 12 jours. Les tissus environnants présentaient une meilleure angiogenèse et une plus grande déposition de collagène, montrant une prolifération plus importante qu'avec les contrôles. Les échafaudages créaient aussi une zone d'inhibition significativement plus grande que les contrôles lors d'essais antibactériens sur des bactéries Gram négatifs et Gram positifs [49].

On remarque lors de ces études que bien que les effets primaires des substances antioxydantes n'incluent pas d'effet proangiogénique, où qu'ils soient secondaires, l'angiogenèse est bien plus importante lors de l'utilisation de ces substances. L'environnement oxydatif diminue la durée de vie et donc l'efficacité des facteurs de croissance proangiogéniques de manière significative. Diminuer ce stress oxydatif est donc proangiogénique.

2.5.2 Échafaudages pro-angiogéniques

Le manque d'angiogenèse dans les DFU est l'un des plus importants facteurs de la chronicité de ces plaies. L'ischémie et l'hypoxie dans les plaies diminuent la prolifération et augmentent le stress oxydatif. Le manque de nouveaux capillaires sanguins empêche la formation d'un tissu de granulation sain et donc la fermeture de la plaie. Plusieurs matériaux électrofilés ont tenté de répondre à ces problèmes, en incorporant des substances bioactives à des matériaux électrofilés.

Médicaments pro-angiogéniques

L'hyperglycémie interfère dans les voies de signalisation moléculaires, et diminue ou augmente la production de certaines molécules. La voie de signalisation facteurs induits par l'hypoxie 1 (HIF-1) est notamment liée à la production de VEGF en réaction à une hypoxie locale dans les tissus. Le facteur de transcription HIF-1α est une protéine qui est dégradée quand la concentration en oxygène est normale. Dans un environnement hypoxique, cette sous-unité investit le noyau et provoque la transcription d'ARN nécessaire à la production de VEGF entre autres. Dans un environnement hyperglycémique et donc soumis à une abondance de ROS, l'un des coactivateurs du facteur de transcription HIF-1, l'unité p300, est modifiée par une molécule appelée méthylglyoxal, situation induite par les ROS liés à des ions de fer présent dans le milieu [50]. En conséquence, même dans cette situation hypoxique, la production de VEGF ne peut pas avoir lieu. D'autre part, la HIF-1α est dégradée de manière trop importante. La desferroxamine (DFO) est une substance qui permet de chélater les ions de fer, et de les empêcher d'interagir avec les ROS, permettant au coactivateur p300 de se lier au HIF-1 et d'amorcer la production de VEGF. De la DFO a été électrofilée avec du PVA et du chitosane afin de produire un hydrogel. Cet hydrogel a ensuite suivi un test d'angiogenèse *in vitro* et été utilisé dans les plaies de rats diabétiques. Les tests de formation de tube ont montré que des capillaires se formaient plus rapidement que dans le contrôle, mais aussi avec une épaisseur supérieure. Les plaies pratiquées sur des rats diabétiques se ferment jusqu'à deux fois plus vite. Les analyses ont montré une production accrue de HIF-1 et de VEGF dans les plaies traitées comparées au contrôle [51].

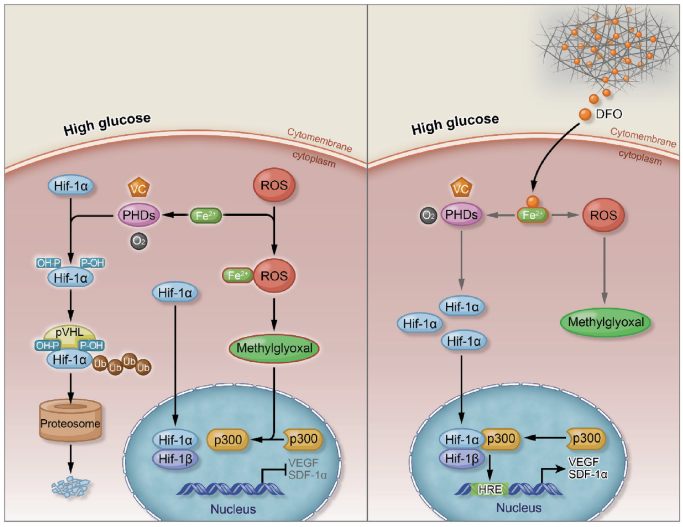


FIGURE 2.6 Action de la DFO sur la voie Hif-1α (tiré de [51])

Une autre substance proangiogénique est la dimethyloxalylglycine (DMOG). Cette substance agit aussi sur la voie du HIF-1, mais en inhibant les prolyl hydroxylases qui interviennent dans la dégradation du HIF-1α. Dans une étude, la DMOG a été électrofilées dans des fibres coaxiales de polycaprolactone et de collagène de type I, le cœur des fibres étant chargé en DMOG, contrairement à la surface extérieure. Cette structure coaxiale a permis de ralentir le relâchement de DMOG comparé à des fibres monoaxiales contenant la même quantité de DMOG. Au bout de 14 jours, plus de 90% du DMOG étaient relâchés dans le cas des fibres monoaxiales comparé à moins de 80% pour les fibres coaxiales. Les fibres coaxiales ont permis de significativement augmenter la production de HIF-1α et de VEGF dés le jour 4 et ont presque doublé ces productions comparé aux fibres monoaxiales au jour 7 lors d'études *in vitro* sur des fibroblastes de prépuce humain [52]. Dans une autre étude, du polyprolactone a été électrofilé avec du DMOG et a permis de significativement augmenter la production de facteurs de croissance et de diminuer la production de facteurs pro-inflammatoire lors d'une expérience *in vivo* sur des rats diabétiques, ce qui suggère que le profil de production de cytokines des macrophages présents a changé lors de l'expérience [53]. Dans une autre recherche, des nanoparticules de silice mésoporeuses ont été chargées de DMOG et électrofilées sur des fibres d'acide polylactique alignées [54]. Cet échafaudage combine donc les effets du DMOG avec ceux du relâchement d'ions de silice dans le milieu extracellulaire. Les ions de silice sont connus pour promouvoir l'angiogenèse en stimulant la production de VEGF et de bFGF [55]. Ces fibres ont montré des résultats supérieurs aux contrôles concernant la formation de tubes lors d'essais d'angiogenèse *in vitro*, avec une longueur totale plus importante et un plus grand nombre d'interconnexions entre ces tubes. L'expression génétique

de divers facteurs de cellules endothéliales de cordon ombilical humain a aussi été mesurée, la production de HIF-1α et de VEGF a été plus importante avec les fibres produites comparé au contrôle. Les fibres produites ont été testées *in vivo* sur des souris diabétiques, et il a été montré que l'échafaudage augmentait grandement la production du récepteur CD31, qui permet aux cellules endothéliales de recevoir la VEGF, entre autres. Après 15 jours de traitement, la déposition de collagène I était plus de 6 fois supérieure à celle de type III, montrant un stade de cicatrisation plus avancé [54].

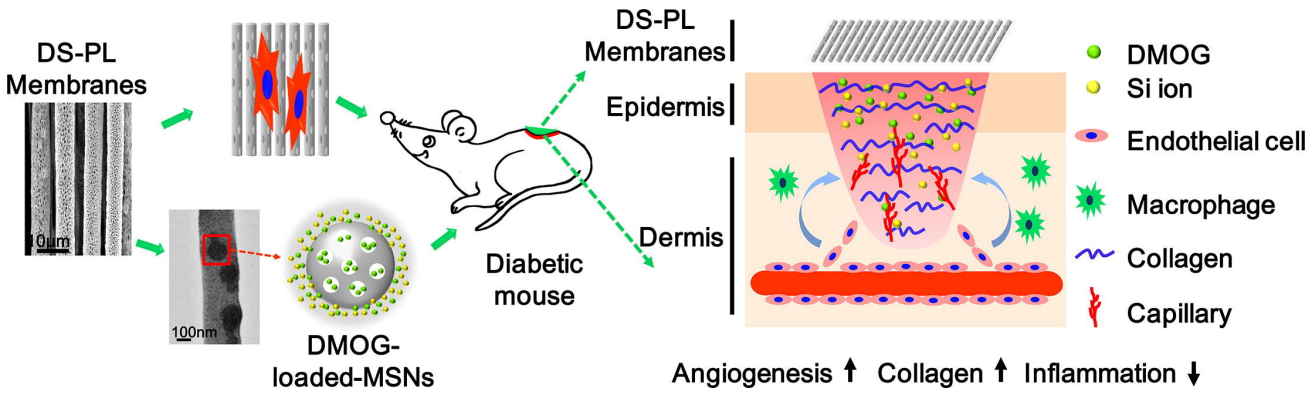


FIGURE 2.7 Fibres de PCL alignées et poreuses chargées avec des nanoparticules de silice mésoporeuse remplies de DMOG (tiré de [54])

Verre bioactif

Des matériaux à priori inertes peuvent aussi avoir des effets proangiogéniques. Le verre bioactif (BG) est un matériau développé dans les années 60 et utilisé à des fins d'ostéogenèse [56]. Le Bioglass® (appellation commerciale du verre bioactif 45S5) a ensuite été utilisé comme matériau ostéoconducteur. Le BG contient des ions possédant des effets thérapeutiques et qui sont progressivement relâchés dans le milieu à mesure que le matériau est résorbé.Par exemple, dans sa formulation initiale, le Bioglass® contient du SiO_2, du CaO, du Na_2O et du P_2O_5 et relâche donc des ions de silice, de calcium, de sodium et de phosphore. Les ions de phosphore et de silice sont connus pour stimuler la production de facteurs de croissance proangiogéniques qui stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les ions de calcium motivent la prolifération et la migration des fibroblastes et des kératinocytes entre autres. Ce type de verre provoque aussi la précipitation d'hydroxyapatite à sa surface et a donc la capacité de se lier aux os [56]. Ce matériau et ses différentes formulations ont donc attiré beaucoup d'attention dans le traitement des blessures, et notamment des plaies diabétiques, depuis le début des années 2000 [57].

Variations de composition du verre bioactif Le verre bioactif n'est pas limité qu'à sa première composition (45S5) et a depuis été le sujet de nombreuses recherches. Le verre 45S5 est basé sur le silicate, mais les verres basés sur le silicate comme base du réseau présentent des limites. La dissolution de ce type de verre amène à une passivation de la surface de ce dernier, et donc à l'arrêt de sa dissolution, suite à l'établissement d'une couche riche en silice à la surface du matériau qui empêche le passage des ions. Si l'implant est trop volumineux, il peut devenir recouvert d'une couche fibreuse [58]. Bien que possédant un effet antibactérien, cet effet pourrait être dopé grâce à l'ajout d'ions bivalent, comme le cuivre ou le zinc [59]. D'autres compositions ont donc été conçues, comprenant différents pourcentages de silice, calcium, sodium, etc., afin d'améliorer cette composition ou du moins de l'adapter à différents contextes thérapeutiques. Parmi les dérivés proches, on peut citer le BG S53P4, le BG 8625 ou encore le BG 13-93, chacun comportant des variations de concentration en silice, calcium, etc., mais aussi d'autres espèces, comme le magnésium et le potassium dans le cas du 13-93. La question de la toxicité de ces produits de dissolution, notamment les oxydes métalliques, peut se poser. Cependant, bien qu'une cytotoxicité puisse être constatée lors d'essais *in vitro* sur des cultures de cellules diverses, elle n'est généralement pas constatée dans le contexte dynamique des essais *in vivo* pratiqués sur différents animaux [60,61]. La toxicité de certains oxydes métalliques peut être grandement mitigée en diminuant la proportion de ces oxydes dans le BG. Une étude a démontré qu'un pourcentage d'oxyde de zinc à plus de 1.2% dans un certain type de BG avait un effet cytotoxique sur des cultures de cellules *in vitro* mais que des concentrations inférieures ne montraient pas cet effet [62]. L'utilisation de BG à la dissolution plus lente est un autre moyen de limiter la toxicité du matériau.

Parmi ces innovations, les verres à base de borate sont parmi les plus récents. Dans ce type de verre, le borate remplace le silicate en tant que centre du réseau. Le bore possède des propriétés de guérison des plaies, il régule notamment la déposition de collagène et favorise la migration des kératinocytes [63]. Les verres à base de borate évitent la production d'une couche riche en silice à leur surface, et continuent donc à se dégrader au cours du temps, c'est aussi une qualité partagée par les verres à base de phosphate [64]. Lors de l'étude de la dégradation du BG 13-93 comparé à sa variation à base de borate, le BG 13-93B3, la version à base de borate a perdu près de 60% de sa masse en 80 jours d'exposition à du fluide corporel simulé contre moins de 10% pour le BG à base de silicate [65]. Il est important de noter que ces résultats concernent des constructions de BG épaisses de plusieurs centaines de µm et avec un ratio volume : surface bien plus élevé que pour des nanoparticules ou micro/nanofibres de verre mentionnées plus bas. Différentes études ont montré que la rapidité de dissolution des micro/nanostructures était corrélée avec la diminution de taille de ces structures [66, 67].

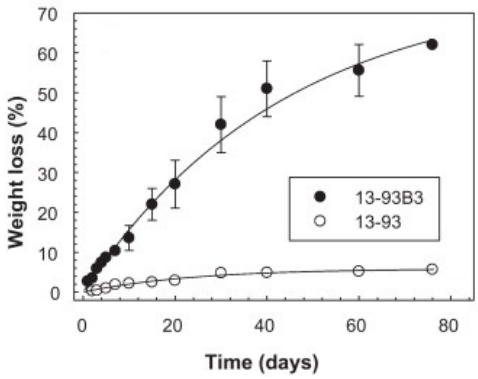


FIGURE 2.8 Pertes de poids du verre 13-93B3 comparé à son équivalent à base de silicate (tiré de [65])

Utilisation en électrofilage

Des fibres de PVA contenant des nanoparticules de BG 45S5 ont été électrofilées comme troisième couche de matériau par-dessus une couche de chitosane et une couche de chitosane-PVA électrofilée [68]. Les fibres de PVA contenaient jusqu'à 40% de masse de nBG. les concentrations maximales (20 et 40%) ont diminué la rigidité, l'élongation à la rupture et la contrainte maximale applicable aux fibres, les nanoparticules devenant des points de concentration des contraintes à des concentrations aussi élevées. La présence de nBG par-dessus les deux couches a permis de significativement augmenter la production de VEGF et de bFGF dans des cultures *in vitro* comparé au même échafaudage, mais sans nBG. Des tests *in vivo* sur des rats ont montré que le matériau comportant des nBG étaient mieux vascularisés que les plaies n'étant pas traitées avec des nBG. Les blessures pratiquées étaient refermées à 50% après 7 jours de traitements contre 25% avec un contrôle. De plus, les coupes histologiques montrent que les nBG ont permis la repousse des glandes sébacées et des follicules, ce qui montre l'effet régénératif des nBG [68]. Des nBG ont été électrofilées avec du polyprolactone et du collagène à des fins de traitements de plaies diabétiques [69]. Les tests *in vivo* ont permis de démontrer que la présence de verre bioactif augmentait fortement l'expression du récepteur CD31 chez des cellules endothéliales. Le récepteur CD31 permettant de recevoir les facteurs de croissance proangiogéniques, l'effet dans les expériences *in vivo* a été une vascularisation plus intense des plaies. Après 21 jours de traitement, les plaies de rats diabétiques traitées avec ces fibres présentaient bien moins de tissu cicatriciel que des plaies traitées avec un contrôle [69].

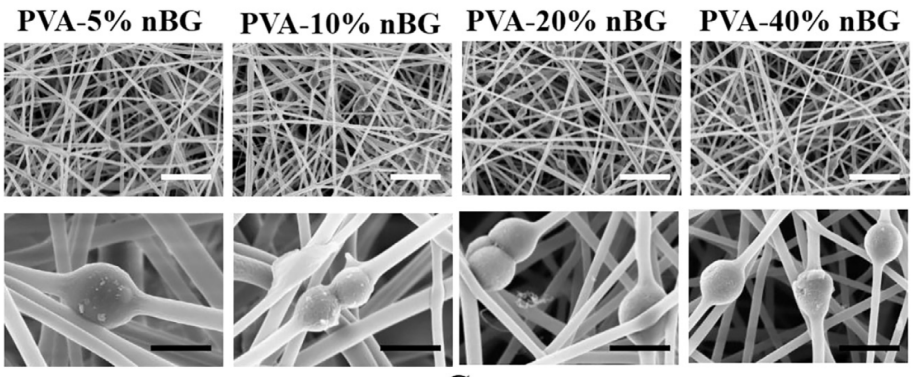


FIGURE 2.9 Structure de la matrice PVA-BG, image obtenue par microscopie électronique à balayage (tiré de [68])

Utilisation commerciale pour la guérison des plaies

Il existe des produits contenant du BG approuvés par la FDA et pouvant être utilisés dans le cadre de plaies chroniques, notamment les plaies diabétiques. Mirragen® (ETS) est une matrice de fibres de BG à base de borate, le BG 13-93B3. La matrice fibreuse est placée dans une plaie et est résorbée par les tissus lors de la cicatrisation. Une étude multicentrée faite en 2022 a comparé la cicatrisation des plaies de patients atteints de DFU lors du traitement par Mirragen® ou par un pansement à base de collagène et d'alginate pendant une période de 12 semaines [70]. Après ces 12 semaines, 70% des plaies traitées avec Mirragen® étaient fermées contre 25% des plaies traitées avec le contrôle. Les plaies traitées avec le BG étaient refermées plus vite et moins sujettes aux infections. De façon surprenante, Mirragen® a eu des effets sur la neuropathie des patients au niveau du pied affecté par le DFU, diminuant le score obtenu sur l'échelle de Semmes-Weinstein de 2 points dans le groupe traité contre une diminution de 0,6 dans le groupe contrôle [70]. Un autre produit disponible sur le marché chinois et composé BG en poudre peut notamment être utilisé pour des plaies diabétiques selon son fabricant. Cependant, la seule étude disponible à ce jour concerne la guérison des plaies après une opération chirurgicale anale [71]. Bien que DermFactor® a permis de refermer ces plaies plus rapidement, des études supplémentaires sont nécessaires avant d'affirmer que DermFactor® serait efficace sur des plaies diabétiques. En conclusion, le verre bioactif est un agent proangiogénique puissant et qui présente des effets régénératifs conséquents lors de son application à des plaies diabétiques.

Promouvoir l'angiogenèse est un moyen efficace d'accélérer la guérison des DFU. La néovascularisation permet la formation du tissu de granulation et restaure la fonction des cellules dysfonctionnelles en présence, en limitant le stress oxydatif notamment.



FIGURE 2.10 Produits basés sur des BG et approuvés par des organismes de régulation, Mirragen (à gauche) et Dermfactor (à droite)

2.5.3 Échafaudages basés sur les facteurs de croissance

Le manque de facteurs de croissance est un élément caractéristique des plaies diabétiques. La production de ces derniers est amoindrie et leur durée de vie est affectée par l'environnement oxydatif présent dans la plaie. Amener des facteurs de croissance dans la plaie est donc un moyen de pallier ce manque. Différentes recherches ont tenté d'incorporer des facteurs de croissance à des fibres électrofilées destinées à des plaies diabétiques. Dans cette section, nous allons en revoir certaines.

Des EGF recombinants et de la gentamicine, un antibiotique, ont été électrofilés avec de l'eudragite RS/RL [72]. Des essais *in vivo* sur des souris diabétiques ont montré une fermeture plus rapide comparé au contrôle. Une autre étude a utilisé des bFGF, des EGF et des peptides antimicrobiens LL-37 électrofilés avec de la fibroïne de soie et du PVA comme matériaux porteurs [73]. Les fibres produites ont permis d'augmenter de presque 60% la solidité des blessures une fois refermés, montrant une meilleure qualité de MEC. L'expression du récepteur CD31 a aussi été fortement accrue dans les tissus entourant la plaie, ce qui correspond à la plus grande densité de vaisseaux sanguins trouvée dans les tissus. La réépithélialisation a commencé au jour 14 dans les plaies traitées avec l'échafaudage, alors que les contrôles n'en ont pas expérimenté, on pouvait aussi apercevoir la formation de follicules dans les coupes histologiques au jour 21, mais ce n'était pas le cas dans les contrôles [73].

L'utilisation de facteurs de croissance se heurte souvent au même problème, une monothérapie est rarement efficace, le manque de facteurs de croissance étant multiple. Il est donc fréquent de voir des facteurs de croissance associés à d'autres substances bioactives, comme le montrent certaines études mentionnées précédemment. D'autres problèmes se posent avec les facteurs de croissance. Leur production et leur purification sont très chères, et le produit obtenu est

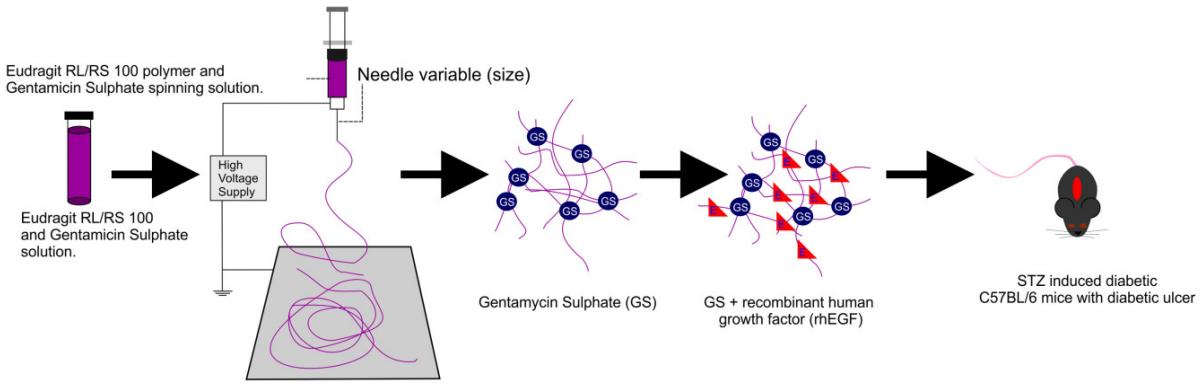


FIGURE 2.11 Synthèse du matériau chargé en gentamicine (GS) et en rhEGF (tiré de [72])

fragile, avec un temps de demi-vie court. Comme mentionné quelques paragraphes plus haut, deux solutions sont disponibles pour amener facilement plusieurs facteurs de croissance en grande quantité dans une plaie : l'usage de PRP ou de PRF. Ces substances contiennent de grandes quantités de facteurs de croissance, notamment des PDGF, des bFGF, des VEGF et des TGF-α. De plus, des recherches montrent que le PRP sous forme lyophilisé peut avoir une durée de vie de plus de 9 mois à 4°C [74]. Les préparations de lysat de PRP lyophilisé ont un potentiel pour un relargage contrôlé de facteurs de croissance, une étude précédente a montré que ce dernier pouvait durer jusqu'à 35 jours dépendamment du type de facteur de croissance [75]. Différentes recherches ont été menées afin d'importer ces facteurs de croissance en utilisant des nanofibres comme moyen de délivrance. Losi et al. ont électrosprayé du lysat de PRP lyophilisé avec du fibrinogène avant de pulvériser de la thrombine sur le matériau pour provoquer la polymérisation de la fibrine [76]. Lors de tests *in vivo* sur des souris diabétiques, l'échafaudage a permis de réduire de 80% la taille de la blessure contre un peu plus de 40 % dans le cas d'un échafaudage de fibrine. Les fibres ont relâché une grande quantité de facteurs de croissance lors de leur application (environ 40%) pour finalement avoir relâché 80% de leurs facteurs de croissance au jour 7. Les effets de cet échafaudage ont été comparé avec un autre échafaudage contenant des FGF et VEGF recombinants, et ont obtenu des résultats similaires dans la guérison des plaies diabétiques [76].

Les plaquettes contiennent aussi de la thymosine beta 4 (T-β4), une molécule ayant parmi ses propriétés de pouvoir polariser les macrophages M1 en M2. Les plaquettes sont donc aussi un moyen de contrôler directement le processus inflammatoire. Dans leur étude, Zhang et al. ont électrofilé du PLA ayant réagi avec du polyéthylène glycol [78]. L'échafaudage est ensuite plongé dans une solution contenant de la T-β4, puis dans du PRP afin d'absorber des plaquettes. L'application du matériau sur des blessures de souris diabétiques a montré que le matériau avait presque complètement fermé les plaies au jour 14, alors que le contrôle n'était

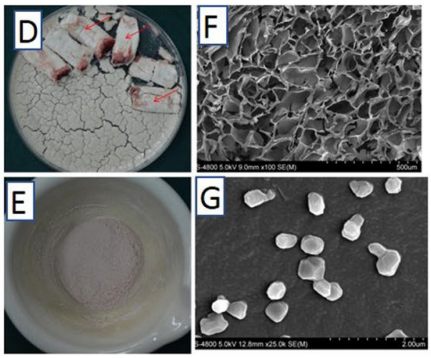


FIGURE 2.12 PRF lyophilisé puis mis sous forme de granule (tiré de [77])

pas fermé au jour 21. Un scratch assay a permis de montrer que seul ce nouvel échafaudage pouvait fermer un fossé en 48 h, aucun des autres matériaux ne l'ayant permis. Le matériau a aussi permis de changer le profil d'expression génétique de macrophages pro-inflammatoires en diminuant leur production de TNF-α et en augmentant leur production de IL-10, un facteur anti-inflammatoire [78].

Un inconvénient des produits à base de plaquettes est l'origine de ces dernières. Le PRP et le PRF sont tirés de prélèvements sanguins chez le patient traité, mais pour produire des produits à base de plaquette et électrofilés, il est peu probable que cette option soit possible. De plus, le montant de plaquettes présent dans la préparation de PRP ou de PRF pourrait varier selon l'état de santé du patient [79], ou la méthode de préparation du concentré, qui ne connaît pas de consensus actuellement [80]. Une solution serait d'utiliser du PRP ou du PRF allogène, tiré de banques de sang. Cette technique pourrait possiblement poser des problèmes d'innocuité, le PRP et le PRF contenant du matériel pouvant être rejeté par le donneur, différentes recherches ont alors été tentées pour mesurer cette possibilité de rejet, y compris sur des humains. Une recherche a étudié l'utilisation de concentré de plaquette provenant de banques de sang, activée par de la thrombine pour obtenir du PRF, sur des DFU [81]. Les traitements n'ont pas généré d'effets secondaires notables et les blessures traitées avec le PRF ont guéri en moyenne deux semaines plus rapidement que celles traitées avec un échafaudage de fibrine. Dans une autre étude, les blessures chroniques de 60 patients ont été traitées avec du PRP obtenu à partir de sang provenant de la famille proche des patients [82]. Le taux de guérison a été jusqu'à 3 fois plus élevé chez les patients traités comparés aux patients traités avec la méthode standard et le tissu de granulation était de bien meilleure qualité chez les patients traités. D'autres études sont disponibles concernant l'utilisation de PRP/PRF allogénique, mais comme l'indique une revue de littérature sur le sujet, et la plupart des articles mentionnés, le nombre d'articles disponibles sur le sujet

reste faible, avec des méthodes de production de concentré de plaquettes très variables selon les études [80]. Une standardisation des méthodes et un plus grand volume d'études sont nécessaires avant de pouvoir tirer des conclusions sur l'innocuité de l'utilisation de concentrés de plaquettes allogènes comme méthode de traitement pour les plaies diabétiques.

2.5.4 Échafaudages antibactériens

Les infections répétées sont la principale raison des amputations pratiquées suite à des DFU. Le traitement des ulcères diabétiques demandant parfois plusieurs mois, prévenir les attaques bactériennes sur la plaie est une priorité. Plusieurs échafaudages cités précédemment possèdent des effets antibactériens. Soit par les matériaux utilisés, comme le chitosane [43], soit par les substances bioactives présentes : peptides antimicrobiens, antibiotiques, etc. Un effet antibactérien est souhaitable pour des échafaudages destinés à des DFU, mais loin d'être suffisant pour permettre la guérison d'une plaie chronique. Cette section porte donc sur l'usage d'agents antibactériens dans des fibres électrofilés à destination de plaies diabétiques, et qui comprennent aussi d'autres effets supplémentaires.

L'usage d'un antibiotique simple n'est pas suffisant pour la guérison d'une plaie diabétique, c'est pourquoi des antibiotiques ayant des effets supplémentaires sont particulièrement indiqués. La doxicycline (DOX) est un antibiotique qui a aussi la faculté de lier les ions divalents, et donc d'inhiber les MMPs [83]. Cet antibiotique peut donc combattre les bactéries présentes et diminuer la destruction de la MEC par les MMPs. Dans une étude de 2017, de la DOX a été électrofilé avec de l'alcool de polyéthylène comme couche extérieure d'une fibre coaxiale où le cœur était constitué de polyprolactone et de collagène [84]. Cette couche de fibres était la couche inférieure d'un échafaudage multicouche comportant une couche de chitosane et une couche d'alginate. L'antibiotique étant présent dans la couche extérieure d'une fibre coaxiale, un relâchement fort d'antibiotique a été constaté, ce qui correspond aux attentes pour l'action d'un antibiotique. Une étude suivante comportant des tests *in vitro* et *in vivo* a permis de déterminer les effets du matériau dans un contexte de plaie diabétique [85]. Après 7 jours de traitement sur une plaie de rat diabétique, le matériau a permis de fermer à 50% une plaie contre 25% comparé à un contrôle. Les niveaux de MMPs étaient plus faibles dans le groupe traité comparé au groupe contrôle, et la production de VEGF et de bFGF étaient plus élevées [85].

CHAPITRE 3 PREMIER MATERIAU

Dans la dernière partie, nous avons analysé les besoins d'une plaie diabétique et revu différents matériaux et stratégies pour accélérer la guérison d'une telle plaie. En considérant ces informations, un choix de structure et de matériaux a été fait, consistant en une structure bicouche de PVA, d'alginate et de chitosane, contenant des nBG et des granules de PRP lyophilisé.

Dans cette partie, nous allons décrire ce matériau et expliciter les raisons des choix qui ont été faits. Par la suite, nous allons décrire la conception de ce matériau et les problèmes rencontrés.

Des fibres de PVA et d'alginate ont été produites, cependant leur difficulté de manipulation et le manque de temps ont mené à l'abandon de leur utilisation. Les circonstances liées à cet abandon sont listées à la fin de ce chapitre.

3.1 Matériaux et structure choisis

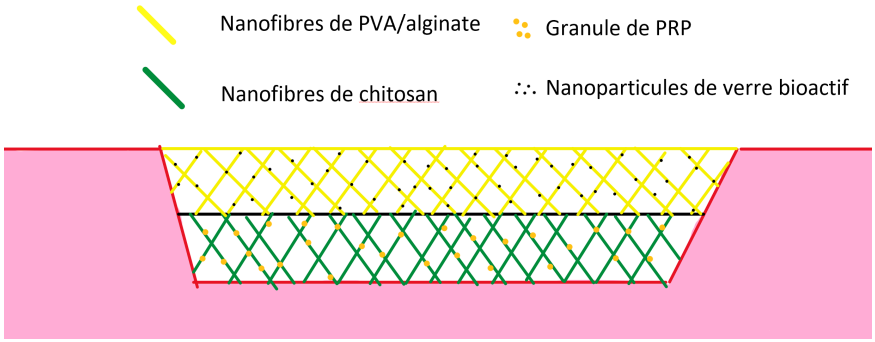


FIGURE 3.1 Schéma de la structure dans une plaie

La structure choisie possède deux couches de composition différentes. Ces différences sont motivées par les besoins variant entre le fond d'une plaie et son extérieur.

La première couche est composée de PVA électrofilé avec de l'alginate et des nBG.

Le PVA est un matériau perméable, qui favorisera l'aération de la plaie et qui gardera les tissus humides [86]. Il est aussi soluble dans l'eau après une période suffisamment longue.

L'alginate possède des capacités de réépithélialisation, qui motiveront une fermeture rapide de la plaie [87].

Des nBG sont ajoutées à ces fibres. Ces particules relâchent des ions ayant plusieurs effets thérapeutiques. Dans ce projet, nous utiliserons des nanoparticules de verres 45S5, semblable au Bioglass [56] qui contiennent des ions de silice, de phosphore et de calcium. Ces ions ont d'une part un effet stimulant la prolifération et l'adhérence des cellules, et de l'autre des effets antibactériens [57] . Cette couche a pour objectif de promouvoir la réépithélialisation tout en conservant des conditions idéales pour la guérison de la plaie, soit un passage de l'oxygène, une rétention de l'humidité et une protection contre les bactéries.

La seconde couche est composée de chitosane, dont la structure présentée à la figure 3.2, et contenant des granules de PRP lyophilisé.

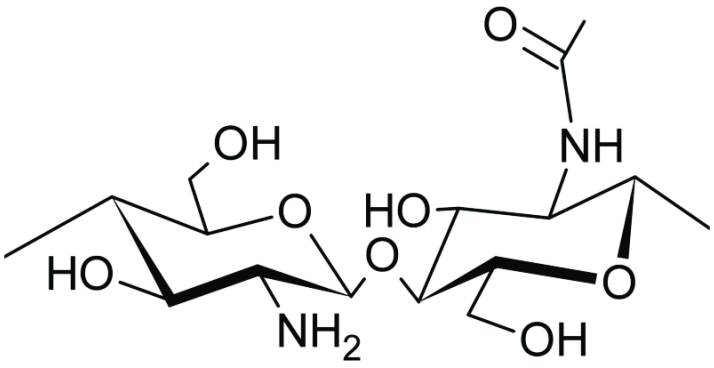


FIGURE 3.2 Structure du chitosane avec le monomère déacétylé (à gauche) et acétylé (à droite)

Le chitosane est un matériau biodégradable soutenant la prolifération cellulaire et ayant des effets antibactériens [43]. Il empêchera le développement bactérien dans le fond de la plaie et promouvra la croissance du tissu de granulation.

Le PRP lyophilisé est un moyen d'amener de nombreux types de facteurs de croissance différents dans la plaie qui favorisera l'angiogenèse, la prolifération et l'adhésion des cellules présentes [80]. Cette couche a pour objectif de promouvoir la production du tissu de granulation et de réduire la possibilité d'infection bactérienne.

3.2 Développement et stratégies envisagées

3.2.1 Première couche

Le PVA est un polymère facilement électrofilable, mais ce n'est pas le cas de l'alginate. L'alginate est une molécule dont les différentes fonctions (alcool et acide carboxylique) peuvent former des ponts hydrogènes en milieu aqueux. Ces ponts hydrogènes augmente la rigidité

des molécules d'alginate [88]. Il n'y a donc pas de possibilité d'entrelacement suffisant à la production d'une fibre avec l'électrofilage. Il est possible de produire des fibres d'alginate en utilisant un second polymère comme porteur [88]. Des molécules de ces polymères porteurs s'entrelacent, formant une fibre, et forment des liaisons hydrogène avec les molécules d'alginate, les entrainant lors de leur sortie du cône de Taylor. Ces polymères sont notamment le PVA et le PEO. Le PEO ne convient pas à notre projet, car le temps nécessaire à sa dégradation est bien supérieur au temps de fermeture d'une plaie ordinaire, il a eu besoin en effet d'environ 8 semaines pour perdre seulement 10% de sa masse dans une précédente étude [89]. Les propriétés précédemment citées du PVA (perméabilité à l'air et conservation de l'humidité) le rendent aussi particulièrement intéressant dans le cadre de la guérison des plaies.

Paramètres d'électrofilage

Le tableau 3.1 répertorie une partie des utilisations de PVA et d'alginate électrofilé ensemble et les paramètres de la solution d'électrofilage utilisée. L'alginate et le PVA sont toujours mélangés dans de l'eau désionisée. Ces paramètres ont été utiles pour déterminer les valeurs de départ à utiliser pour électrofiler le PVA et l'alginate.

Tableau 3.1 Compositions de fibres de PVA et alginate selon différentes recherches C - concentration (w :v) ; R - Ratio (w : w ; PVA : SA) ; P - Poids moléculaire (PVA) ; T - Tension (kV) ; D - Débit ($ml.min^{-1}$) ; d - distance (cm)

C	R	P	T	D	d	source
6%	84 :16	125 kDa	17	0.14	10	[90]
7%	95 :5	72 kDa	15	30	15	[91]
8%	90 :10	/	15	0.4	10	[92]
8%	96 :4-94 :6	72 kDa	15	1	10	[93]
8-9%	94 :6-97 :3	137 kDa	12-18	0.28-0.75	15	[94]

De manière générale, les pourcentages en polymère se situent entre 6 et 9% et le ratio PVA : SA se situe entre 85 :15 et 95 :5. différents poids moléculaires sont utilisés pour le PVA, mais cela semble avoir peu d'incidence sur les concentrations utilisées. La tension à utiliser devrait être entre 15 et 20 kV, et la distance d'électrofilage entre 10 et 15 cm.

La proportion d'alginate de sodium utilisée influence le diamètre des fibres [91, 93]. Le PVA interagit avec le SA avec des ponts hydrogène, ce qui diminue la densité de charges libres en surface de l'alginate. Si la proportion d'alginate diminue, alors la densité de charge de la solution diminue et les fibres produites seront plus épaisses. Augmenter la proportion en alginate a aussi tendance à provoquer l'apparition de billes sur les fibres et donc à diminuer

leur uniformité [91, 93, 95]. Si la concentration en PVA est trop faible et que la proportion d'alginate est trop grande, le mélange n'est plus électrofilable et des gouttes sont obtenues. Le choix des proportions dépend donc de l'équilibre à obtenir entre la finesse et l'uniformité des fibres.

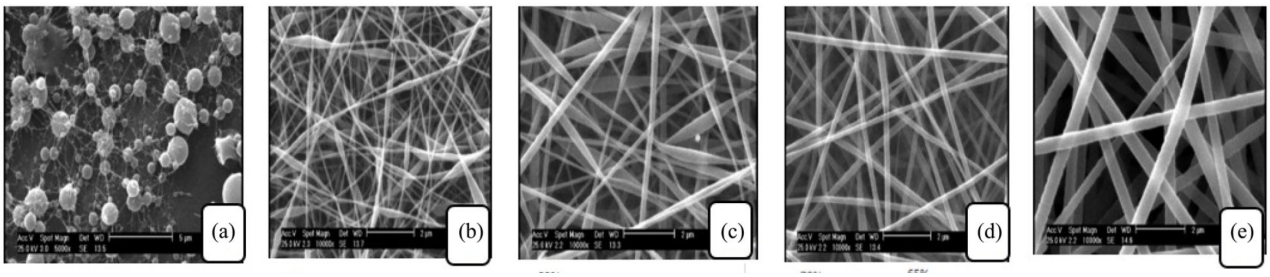


FIGURE 3.3 Images de fibres de PVA et SA obtenues au MEB. Obtenues en mélangeant des solution 10% PVA et 2% alginate selon les ratios suivants : (a) 1 :1, (b) 2 :1, (c) 3 :1, (d) 4 :1, (e) 5 :1 (PVA : alginate, V : V) [93]

Résistance à l'eau

Le PVA et l'alginate sont solubles dans l'eau. Cela rend la préparation de solution d'électrofilage simple, mais peut impacter la durée de vie de cet échafaudage dans un milieu humide. Plus tard dans l'étude, un simple trempage dans du tampon phosphate salin (PBS) a instantanément dissous les fibres. Il faut diminuer cette solubilité pour obtenir un matériau utilisable.

Degré d'hydrolyse du PVA

Le PVA est un matériau variant non seulement en poids moléculaire, mais aussi en degré d'hydrolyse. Le PVA est un matériau issu de l'hydrolyse du polyacétate de vinyle (présenté sur la figure 3.4). Les groupements acétates, hautement solubles, sont hydrolysés en groupements alcool. Le degré d'hydrolyse est le pourcentage de fonction alcool présent sur une molécule de PVA. Plus ce pourcentage est bas, plus le PVA est soluble. Les degrés d'hydrolyse varient de 70 à 99%. Le PVA hydrolysé à 89% est soluble dans l'eau à température ambiante, alors que le PVA hydrolysé à 99% ne sera soluble que dans de l'eau à plus de 85 °C. Augmenter le degré d'hydrolyse du PVA permettrait à l'échafaudage d'améliorer sa durée de vie dans l'eau.

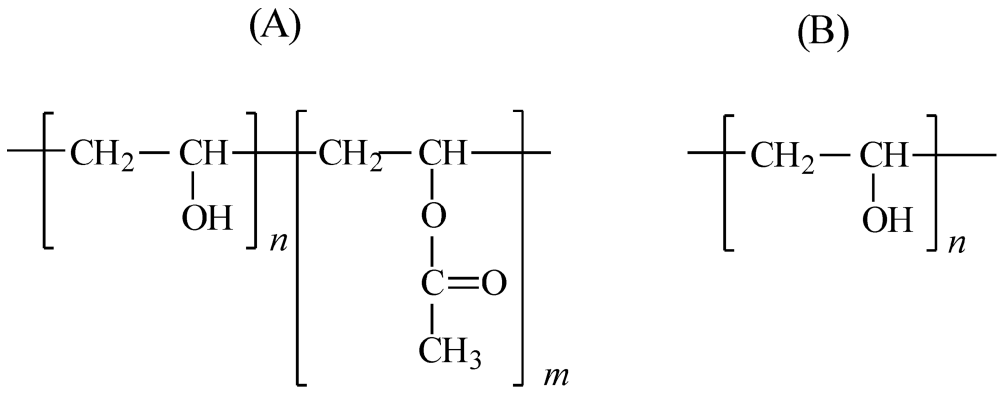


FIGURE 3.4 (A) Structure du PVA partiellement hydrolysé, (B) structure du PVA complètement hydrolysé [96]

Réticulation

La réticulation du matériau est une méthode efficace pour augmenter sa résistance à l'eau. Il est possible de réticuler électrostatiquement l'alginate à l'aide d'ions divalents, notamment de strontium ou de calcium [97], mais les faibles contenus en alginate des fibres (10-15%) ne suffiront pas à protéger l'entièreté du matelas de fibre. La réticulation chimique du PVA est possible avec différentes méthodes. La plus répandue est l'utilisation de GA [98]. Les fibres de PVA sont exposées à des vapeurs de GA chauffées et une réaction d'estérification se produit, créant des liens acétal entre les molécules de PVA. Ce mécanisme est décrit sur la figure 3.5. Ce procédé est très efficace, mais possède plusieurs problèmes en pratique. Les vapeurs de GA sont toxique et inflammables, ce qui rend sa manipulation et sa chauffe dangereuse. Des traces de GA peuvent rester présentes dans le matériau à la fin du procédé, nécessitant un passage dans un four à vide pour éliminer les traces restantes.

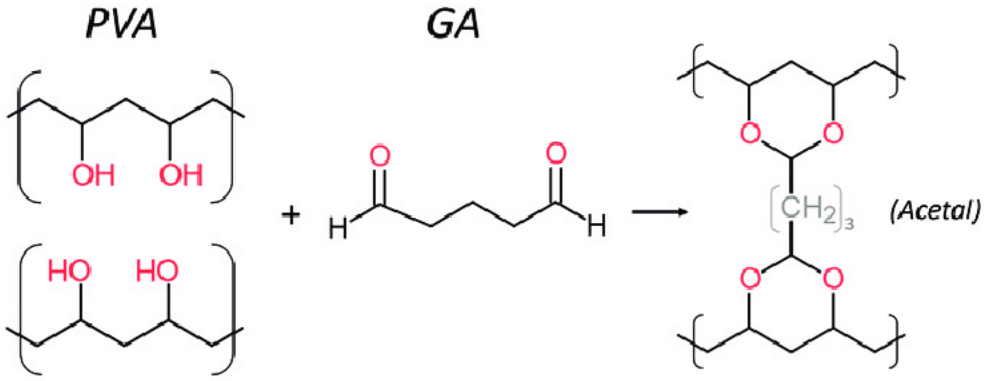


FIGURE 3.5 Mécanisme de réticulation du PVA avec du GA [99]

Il est possible de réticuler le PVA à l'aide d'acides carboxyliques. Ces acides sont ajoutés à

la solution d'électrofilage et sont donc contenus dans les fibres de PVA. Un passage des fibres dans un four à vide permet ensuite de déclencher une réaction qui réticule les fibres de façon covalente [100].

Un exemple de réticulation à l'acide citrique est donné sur la figure 3.6.

Cette méthode a plusieurs avantages. Certains acides carboxyliques sont non toxiques et biodégradable. L'élimination des résidus d'acide n'est donc pas nécessaire. L'acide citrique (CA) est un acide qui est facilement disponible et écologique, il est notamment présent dans le corps humain et est une des molécules les plus importantes du cycle de Krebbs [101], il a déjà été utilisé à plusieurs occasions pour réticuler des nanofibres de PVA [90, 102, 103].

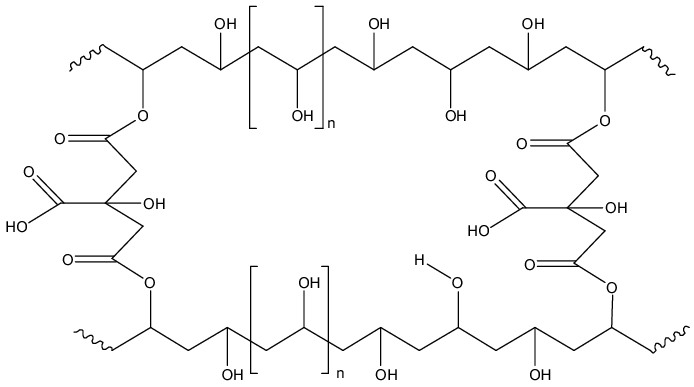


FIGURE 3.6 Structure du PVA réticulé à l'acide citrique [104]

3.3 Expériences et résultats

3.3.1 Paramètres d'électrofilage du PVA hydrolysé à 89% et de l'alginate

Sur base des paramètres d'électrofilage des articles présents dans le tableau 3.1, des paramètres de base pour l'électrofilage de PVA et d'alginate ont été choisis. Le PVA (Sigma-Aldritch, 89% hydrolysé, 85-124 kDa), l'alginate (Sigma-Aldritch, medium viscosity) ont été achetés chez Sigma. Le solvant était de l'eau désionisée venant du circuit de Polytechnique Montréal.

Le PVA et l'alginate sont ajoutés à de l'eau désionisée à une concentration de 8% (wt/v, 9 :1, PVA : alginate, w : w). La solution est mélangée vigoureusement à l'aide d'un mélangeur magnétique au cours d'une nuit. La solution est ensuite électrofilée dans une unité d'électrofilage Tong Li, modifiée pour correspondre aux codes de sécurité électrique locaux. La tension appliquée entre l'aiguille et le collecteur est de 15 kV, la distance entre l'aiguille et le collecteur est de 10 cm, le débit est de 0,5 ml/h. Une étude systématique de l'influence

des différents paramètres sur la taille et la morphologie des fibres a été menée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (SEM) et du logiciel ImageJ pour l'analyse d'image. Le modèle du SEM est le Hitachi TM3030 Plus.

Tableau 3.2 Paramètres étudiés, les paramètres de base sont représentés en gras

Tension (kV)	Débit (ml/h)	Distance (cm)	Ratio (w :w, PVA :alg)
12	0.25	7	85 :15
15	**0.5**	**10**	**90 :10**
18	0.75	13	95 :5
21			

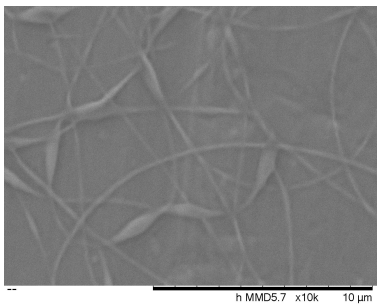
Augmenter la tension produit des fibres plus fines, 250 nm de diamètre à 12 kV contre inférieur à 200 nm à 21 kV. La morphologie des fibres reste stable avec des variations d'uniformité, ce qui montre que la tension n'a pas un effet sur cette dernière. Un champ électrique plus intense est lié à des fibres plus fines selon la littérature. Les résultats sont présentés à la figure 3.7

Un débit faible produit des fibres plus fines et peu uniformes, présentant presque des billes, et un débit plus important des fibres plus épaisses et uniformes. Lors du processus d'électrofilage, un débit plus important provoquait la chute de plus de gouttes de solution sur le collecteur, ce qui est destructeur pour les fibres présentes. Le débit de 0,25 ml/h électrofile par intervalle (le jet est discontinu) alors que le jet de 0,75 ml/h produit des gouttes. Le débit de 0,5 ml/h est stable. Les résultats sont présentés à la figure 3.8.

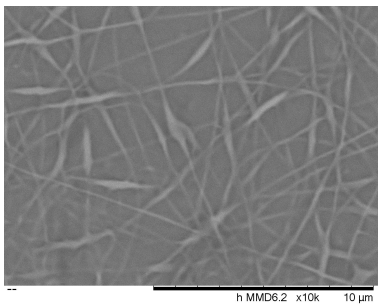
Une distance plus faible produit des fibres en moyennes plus fines. Comme dans le cas de la tension, un champ électrique plus intense produit des fibres plus fines. La distance de 13 cm n'a pas produit de fibres. La distance de 7 cm était marquée par une stabilité dans le processus d'électrofilage qui éliminait presque la chute de goutte de solution sur le collecteur. Les résultats sont présentés à la figure 3.9.

Le ratio 85 :15 n'a pas pu être électrofilé, la trop grande viscosité de la solution n'a pas permis de la mettre dans la seringue. Un ratio plus élevé en PVA donne des fibres plus uniformes et épaisses. Le processus d'électrofilage est aussi plus stable, avec une déposition de fibre plus constante au cours du temps. Les résultats sont présentés à la figure 3.10.

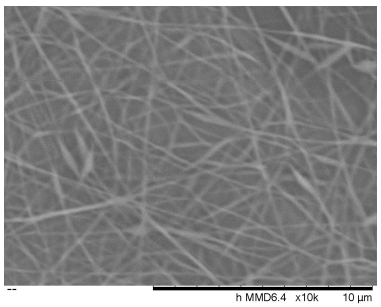
Les évolutions de la taille des fibres en fonctions des paramètres sont minimes, restant entre 150 et 300 nm en moyenne. Des fibres plus épaisses devraient être favorisées, car la taille des pores augmente de pair avec la taille des fibres, une plus grande taille de pore menant à une meilleure infiltration cellulaire et donc une plus grande viabilité cellulaire sur l'échafaudage en pratique. Cependant, au vu de la faible évolution du diamètre et des difficultés du pro-



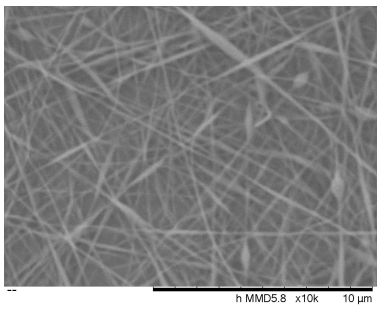
(a) 12kV



(b) 15kV



(c) 18kV



(d) 21kV

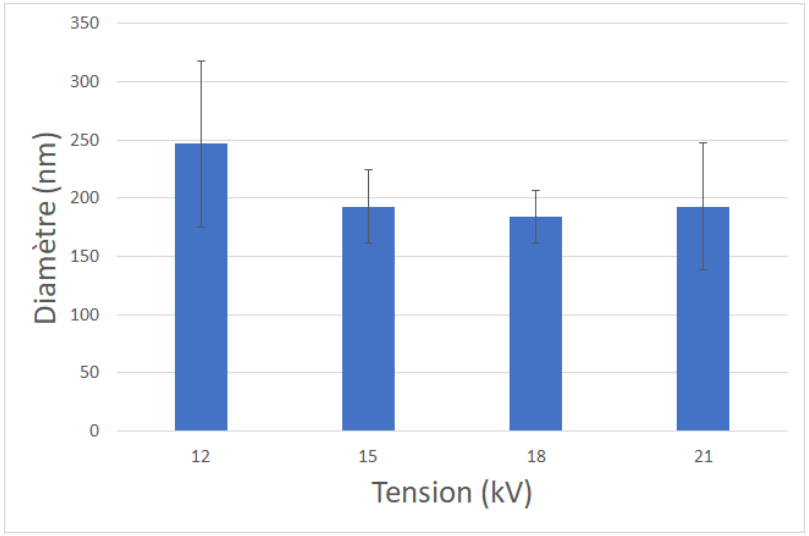


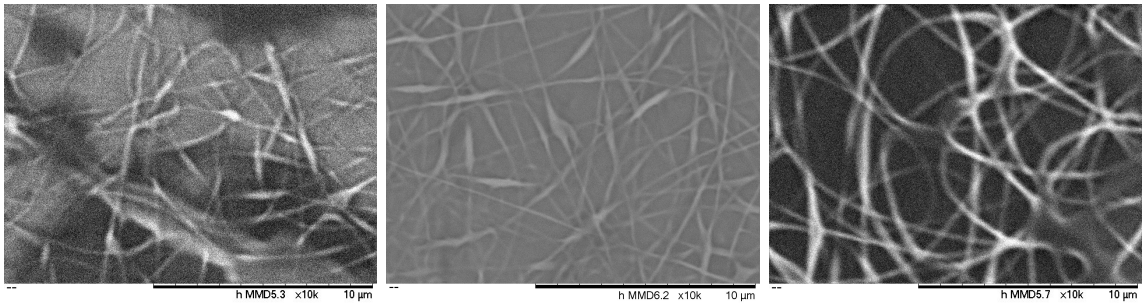
FIGURE 3.7 Effets de la tension sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate

cessus d'électrofilage avec la chute de gouttes sur le collecteur, des paramètres favorisant un électrofilage stable ont été privilégiés.

Il a donc été choisi d'utiliser une distance de 7 cm pour la suite des expériences. Bien qu'augmenter le contenu en PVA des fibres puisse permettre aux fibres d'obtenir une morphologie plus uniforme, il a été choisi de privilégier un contenu d'alginate supérieur en raison de son intérêt pour l'application dans les plaies diabétiques.

Par la suite, quelques expériences ont étudié l'effet de l'augmentation de la tension à une distance de 7 cm. La taille des fibres a peu varié, mais la concentration de ces dernières augmente (le jet est plus dirigé). Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.11

Dans la suite des expériences, le mélange de PVA et d'alginate a été électrofilé à une distance de 7 cm et à une tension de 21 kV.



(a) 0.25ml/h (b) 0.5ml/h (c) 0.75ml/h

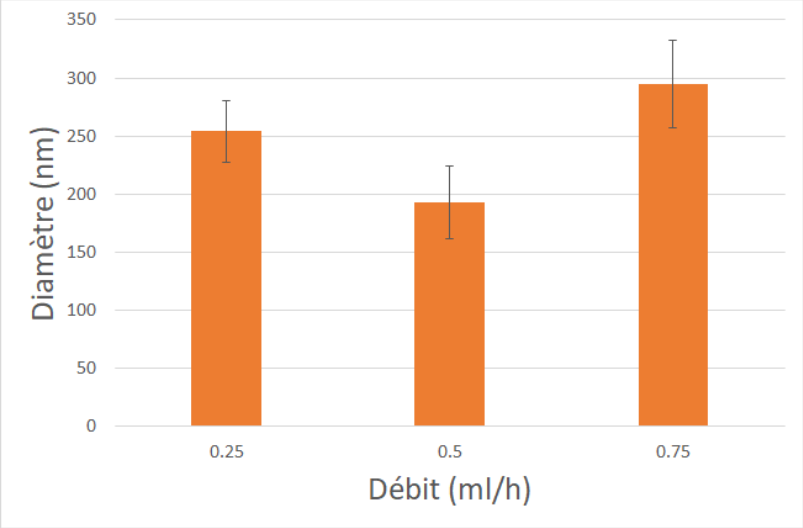


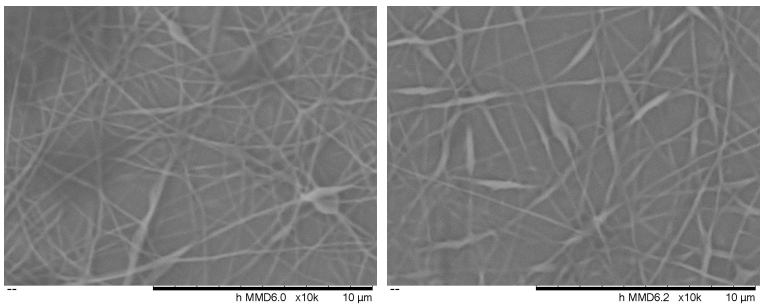
FIGURE 3.8 Effets du débit sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate

3.3.2 Résistance à l'eau

La durée de vie de l'échafaudage doit être suffisant pour maintenir sa structure et soutenir la prolifération des cellules d'une plaie diabétique, et suffisamment courte pour disparaître au même rythme que son remplacement par de nouveaux tissus cicatriciels. Le PVA et l'alginate étant solubles, la durée de vie de l'échafaudage dans un milieu humide était possiblement un problème. Pour la mesurer, une expérience a été prévue, impliquant d'électrofiler différents échantillons de matériaux pendant 1 h 30, puis de les plonger dans du PBS pour des durées de 1, 3, 7, 14 et 21 jours. Les échantillons sont récupérés, séchés, puis examinés au SEM.

Les échantillons de fibres se sont instantanément solubilisés au contact du PBS, ne laissant aucune fibre restante. La solubilité du PVA et de l'alginate, additionnée à la grande surface de contact dû à la structure en fibre, ne permettait pas à l'échafaudage de garder sa structure même temporairement. Les fibres avant et après immersion sont présentées à la figure 3.12

Augmenter la résistance à l'eau était donc nécessaire. Deux moyens d'y parvenir étaient



(a) 7cm (b) 10cm

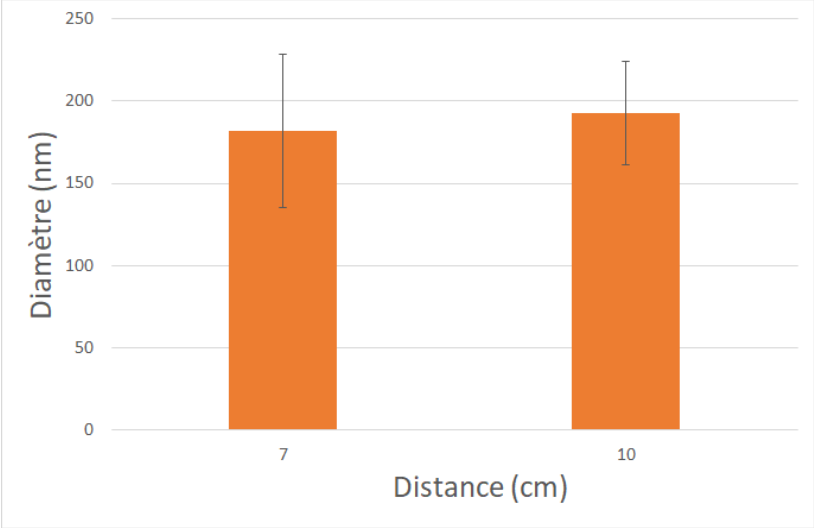


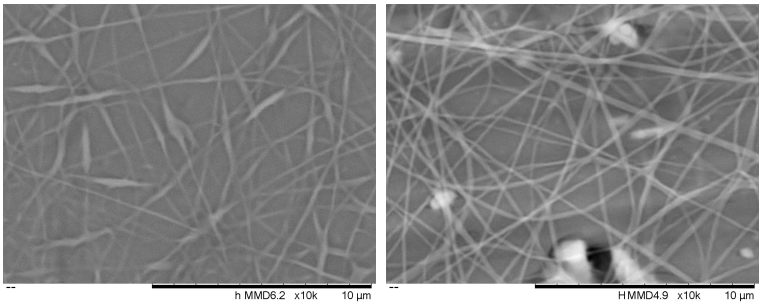
FIGURE 3.9 Effets de la distance d'électrofilage sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate

possibles en conservant le même type de matériau : utiliser un PVA avec un plus haut degré d'hydrolyse, et réticuler les fibres du matériau.

3.3.3 Utilisation de PVA hydrolysé à 99%

Le PVA hydrolysé à 99% consiste en une longue chaîne carbonée associée presque uniquement à des fonctions alcool, quelques fonctions acétate peuvent être présentes, mais en de faibles quantités.

Ceci réduit la solubilité à température ambiante du PVA, même s'il reste soluble dans l'eau, une haute température (plus de 80°C) est nécessaire à sa dissolution dans l'eau. Ceci peut être expliquée par la tendance des groupement alcool à former des groupes hydrogènes au sein de la même molécules de PVA ou avec d'autres molécules de PVA, réduisant l'interaction possible avec des molécules d'eau et donc la dissolution du PVA [105]. Cette haute température empêchait la dissolution simultanée du PVA et de l'alginate dans le même solvant, l'alginate



(a) 90 :10 (b) 95 :5

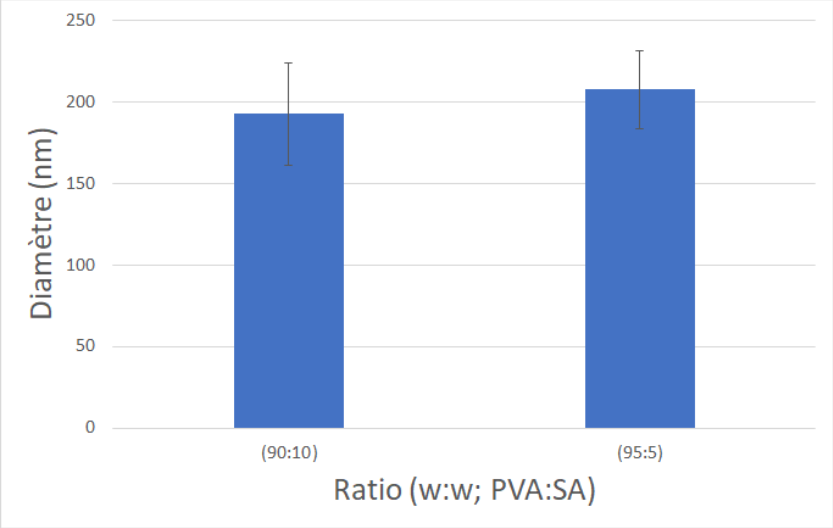
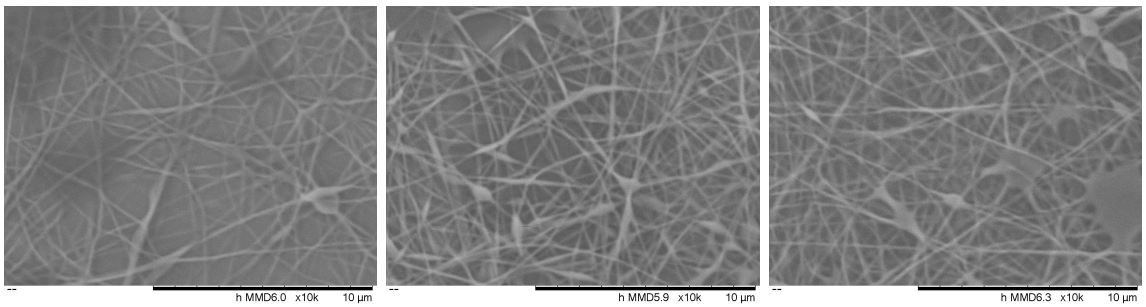


FIGURE 3.10 Effets du ratio massique PVA :SA sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate

se dégradant en solution aux alentours de 90°C, devenant un résidu brunâtre en solution. Le PVA et l'alginate ont donc dû être dissolus séparément en des solutions mères qui étaient ensuite mélangées à température ambiante afin d'obtenir une solution d'électrofilage. Dans la suite du document, nous n'utiliserons donc plus de ratios massiques pour discuter des concentrations relatives de PVA hydrolysé à 99% et d'alginate, mais des ratios volumiques des solutions mère de PVA hydrolysé à 99% et d'alginate.

Dissolution du PVA hydrolysé à 99%

Plusieurs itérations ont été nécessaires pour obtenir un processus de mélange satisfaisant. Des images sont présentées à la figure 3.13.



(a) 7cm - 15kV (b) 7cm - 18kV (c) 7cm - 21kV

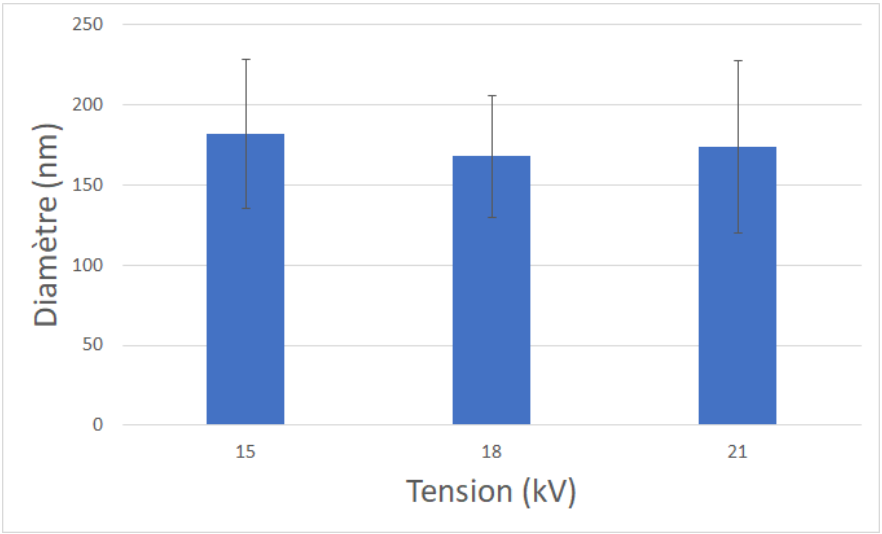
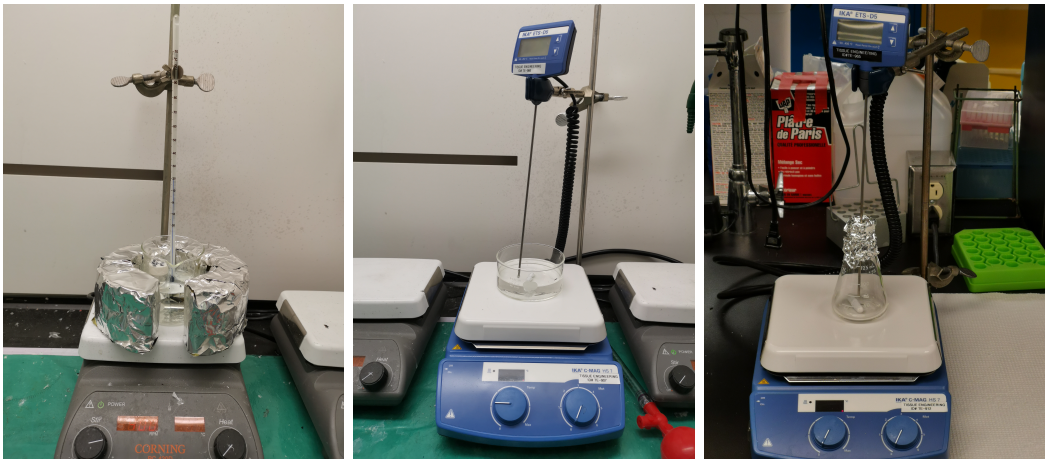


FIGURE 3.11 Effets de la tension à sur le diamètre des fibres de PVA et d'alginate à une distance de 7cm



(a) 1ère itération (b) 2ème itération (c) 3ème itération

FIGURE 3.13 Itérations du montage de dissolution du PVA



FIGURE 3.12 Immersion des fibres (en blanc, à gauche) dans du PBS et résultat après quelques seconde d'immersion (à droite)

La première itération consistait en un bécher rempli d'eau posé sur un mélangeur magnétique chauffant. Un thermomètre permettait de lire la température de l'eau. La solution d'électrofilage était mélangée dans une fiole de scintillation plongée dans le bécher. Ce processus présentait plusieurs problèmes. La température à laquelle amener la solution d'électrofilage est proche du point d'ébullition de l'eau. Un contrôle de la température est donc nécessaire pour éviter une explosion de la fiole liée à l'augmentation de la pression de vapeur dans cette dernière tout en conservant une température adéquate pour le mélange. Cela est possible sous surveillance, mais la dissolution du PVA prend plusieurs heures en pratique, et cela aurait été une perte de temps. De plus au cours du temps, l'eau du bain s'évaporait, ce qui diminuait l'inertie thermique de ce dernier. Finalement, la température de la solution pouvait varier entre le haut et le bas de la fiole, permettant donc au PVA non solubilisé de s'amasser à la surface.

La seconde itération utilisait un mélangeur magnétique chauffant avec un thermomètre électronique utilisé comme rétroaction. Un bain d'huile de silicone était chauffé par la plaque et sa température était maintenue à 85 °C. L'huile de silicone a été choisie pour sa non-volatilité, permettant de garder le niveau du bain stable au cours du temps. La solution d'électrofilage était mélangée dans une fiole de scintillation plongée dans ce bain.

Ce processus permet d'éviter de devoir surveiller le mélange. Cependant, le procédé provoquait facilement des déversements, le nettoyage des contenants et surfaces de travail était demandant en temps. De plus, le problème du PVA s'amassant en surface était toujours présent.

La troisième itération consistait en un erlenmeyer contenant la solution de PVA posé sur le même mélangeur magnétique que précédemment. Le thermomètre est cette fois-ci plongé dans la solution de PVA, au travers d'un film d'aluminium, couvrant l'ouverture de l'erlenmeyer. La température est maintenue à 85 °C au cours du mélange. L'erlenmeyer permet d'utiliser un

mélangeur magnétique de plus grande taille et d'assurer une agitation constante de la surface de la solution, évitant l'amas de PVA à sa surface. Cette solution demande cependant de produire un volume de mélange plus important, au moins 50 ml contre 10 ml précédemment. Cette méthode présente tout de même une limitation, car de la vapeur d'eau peut s'échapper du trou fait par le thermomètre dans le film d'aluminium, cette perte s'est montrée négligeable sur un mélange d'environ 6 h, mais important sur une durée de plusieurs jours. Le mélange doit donc absolument être enlevé de la plaque le matin suivant l'initiation du mélange.

Dissolution de l'alginate

L'alginate se présente sous forme d'une poudre brune. Bien que soluble, cette poudre forme en milieu aqueux des amas qui mettent plusieurs heures à se solubiliser et qui peuvent perturber le mélangeur magnétique.

La solution la plus efficace est d'utiliser un agitateur magnétique en forme de croix pour générer un vortex dans l'eau désionisée. Ce vortex doit être présent avant l'ajout de l'alginate. La poudre doit être ajoutée lentement, dans le but d'éviter de générer des amas, sur le bord extérieur du vortex. Cette méthode permet de dissoudre l'alginate en quelques dizaines de minutes contre près de 6 h dans le cas d'un ajout complet avec un agitateur magnétique en forme de pilule.

Electrofilage

Un bref essai d'électrofilage de PVA et d'alginate a été réalisé afin d'évaluer les paramètres d'électrofilage.

Du PVA est dissous dans de l'eau désionisée afin d'obtenir une concentration de 10% (w/v). De l'alginate est dissous dans de l'eau désionisée afin d'obtenir une solution de 2% (w/v). Ces solutions sont mélangées à un ratio volumique de 4 :1 (PVA : Alginate) afin de créer une solution d'électrofilage. Les paramètres utilisés sont les paramètres optimisés trouvés précédemment, à part pour la tension qui a été mise à 24 kV de base. Cette augmentation est justifiée par l'augmentation de viscosité de la solution d'électrofilage, vu qu'elle est légèrement plus concentrée que la précédente solution (8,4% (w/v) en polymère contre 8% (w/v) précédemment).

Une étude systématique a ensuite été opérée sur l'influence de la tension d'électrofilage, du débit d'injection et de la distance. Les résultats sont présentés à l'annexe A.

Il est important de noter que l'expérience sur la tension et les expériences sur la distance et le débit n'ont pas été réalisées le même jour. Ces expériences ayant eu lieu en fin novembre

2021, de grandes variations de température extérieures et du taux d'humidité dans l'air étaient présentes d'un jour à l'autre à cause du changement de saison. La variation de la condition de base (24 kV, 7 cm, 0,5 ml/h) présente donc une variation d'environ 100 nm dans le diamètre des fibres entre l'expérience menée sur la tension et celles menées sur le débit et la distance. Il est tout de même possible de faire des comparaisons avec des changements de conditions.

La tension a montré peu d'impact sur le diamètre des fibres, une tension plus élevée diminue le diamètre des fibres, mais l'écart-type sur les mesures est bien plus important que la variation de moyenne.

Le processus d'électrofilage du PVA hydrolysé à 99% manque de stabilité contrairement à celui optimisé pour le PVA hydrolysé à 89%. Aucun paramètre n'a permis de supprimer la chute de goutte de solution sur le collecteur. Ces gouttes détruisent les fibres déjà formées, la figure 3.14 montre l'impact de ces gouttelettes sur les fibres examinées au SEM.

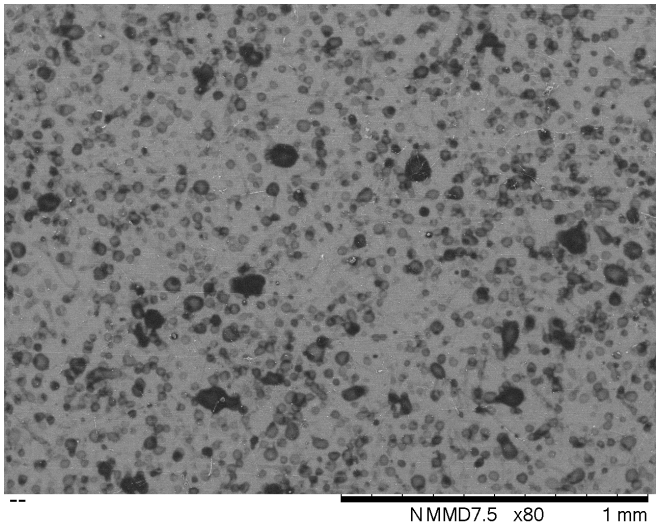


FIGURE 3.14 Image SEM des fibres de PVA hydrolysé à 99% et d'alginate. Les zones couvertes de fibres sont en gris, les zones où les fibres ont été détruites par des goutelettes sont en noir

Résistance à l'eau

Suite au changement de type de PVA, la résistance à l'eau des fibres a été mesurée selon un protocole identique à celui détaillé à la section 3.3.2.

Des fibres de PVA hydrolysé à 99% et d'alginate sont électrofilées et plongées dans du PBS pour des durées variables. Le résultat était une dissolution complète et instantanée des fibres

au contact du PBS.

Changer le taux d'hydrolyse du PVA n'était donc pas suffisant, réticuler le matériau pour diminuer sa solubilité était donc nécessaire.

3.3.4 Réticulation des fibres

Dans le cadre d'une plaie diabétique, un échafaudage cellulaire doit pouvoir passer de 2 à 3 semaines dans un milieu humide sans se désagréger. Les fibres produites jusqu'ici se dissolvaient instantanément dans l'eau, ce qui les rend inutilisables dans un tel contexte. Il est nécessaire d'améliorer leur résistance, une étape de réticulation des fibres permettrait d'améliorer leur résistance à l'humidité.

Comme décrit à la section 3.2.1, il est possible d'utiliser des acides carboxyliques comme agents de réticulation. L'acide citrique a été choisi pour son faible prix, sa facilité d'accès, et la simplicité du processus de réticulation.

De l'acide citrique (monohydrate, Sigma) est dissout dans la solution d'électrofilage. Une fois les fibres électrofilées, elles sont placées dans un four à vide à une température de 70 à 180 °C pendant une durée allant de 30 minutes à plusieurs heures [106]. Une réaction d'estérification se produit entre les fonctions alcool du PVA et les fonctions acides carboxyliques de l'acide citrique, relâchant de l'eau.

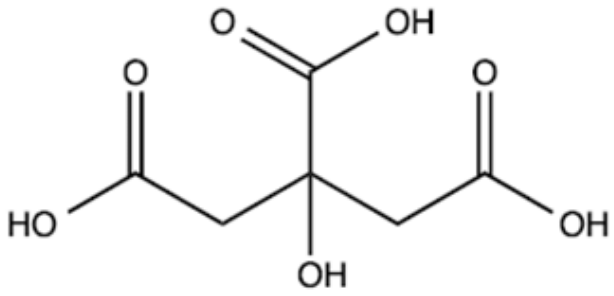


FIGURE 3.15 Structure moléculaire de l'acide citrique

En général, des pourcentages allant de 3 à 15% du poids de polymère à réticuler (ici le PVA) sont ajoutés à la solution d'électrofilage et il peut aussi y être ajouté de l'hypophosphite de sodium, un catalyseur de la réaction d'estérification souvent à 50% de la masse d'acide citrique ajouté [90, 103, 107].

Concentration en acide citrique

La concentration en acide citrique utilisée pour la réticulation des fibres de PVA et d'alginate doit être judicieusement choisie. Une quantité plus grande d'acide citrique permet une réticulation plus complète des molécules de PVA et améliore donc la résistance à l'eau et la caractéristique mécanique du matériau. Cependant un pH trop bas pourrait provoquer la précipitation de l'alginate en acide alginique, un gel insoluble qui nous empêcherait d'électrofiler la solution. Une illustration est disponible à la figure A. Un pH supérieur à 3 dois donc être maintenu afin déviter cette précipitation. 5%wt. d'acide citrique font tomber la solution à un pH de 3,8. 5%wt. sera donc le maximum atteignable ici.

Processus de réticulation

Des fibres de PVA (89% hydrolysé, 85-124 kDa) et d'alginate contenant 5% d'acide citrique sont électrofilées selon les paramètres cités précédemment pendant 8h. Le papier aluminium sur lequel les fibres ont été collectées est ensuite placé dans un four à vide à une température de 120°C pendant 1h30 afin que le processus de réticulation puisse se dérouler.

Suite à cette étape, le matériau est examiné à l'aide d'une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourrier. Cette dernière aurait du permettre de percevoir un pic entre 1250 et 1050 cm^{-1} à cause de l'étirement des liens C-O-C qui relient une chaîne de PVA à une autre. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir un spectre acceptable en pratique.

3.4 Obstacles rencontrés et abandon du matériau

A ce stade du projet, plusieurs obstacles se sont montrés de plus en plus évidents et nous ont motivés à abandonner ce matériau :

- Après mesure, 8h d'électrofilage ne permettait d'électrofiler qu'un peu moins de 40µm d'épaisseur de matériau sur une surface d'environ 150 cm^2, ce qui est une très faible quantité de matériau.
- Les fibres n'ont pas pu être séparées du papier aluminium, même après réticulation, rendant la majorité des expériences impossibles, et rendant le matériau inutilisable dans le contexte de guérison des plaies
- La solubilité du matériau était trop importante, et les différentes tentatives pour augmenter sa résistance à l'eau n'ont pas été fructueuses

Le temps restant à cette maîtrise étant limité, et le matériau étant trop loin d'un résultat utilisable pour obtenir des résultats valables après plusieurs expériences, il a été décidé d'uti-

liser un matériau mieux connu de notre équipe de recherche pour pouvoir finaliser ce projet. Ce matériau est détaillé au chapitre suivant.

CHAPITRE 4 SECOND MATÉRIAU

Les problèmes liés à l'électrofilage du PVA et de l'alginate n'ont pas pu être surmontés afin de créer un matériau facilement manipulable. Le matériau ne remplissait pas les critères nécessaires à la guérison d'une plaie diabétique.

Afin d'obtenir des résultats permettant de finir ce mémoire, un nouveau matériau à base de PLAet de nBGa donc été conçu. Les paramètres d'électrofilage du PLA ont été tirés du travail d'une étudiante en doctorat du département de génie chimique de Polytechnique Montréal [108]. Ces travaux ont été faits sur le même montage d'électrofilage que celui utilisé dans ce mémoire. Ce choix a été fait afin de limiter le temps d'optimisation nécessaire à l'obtention d'un matériau testable, le solvant et le polymère utilisés sont donc rigoureusement les mêmes que dans l'article cité.

Ce chapitre détaille la conception de nanofibres de PLA et denBG, les expériences réalisées sur ce matériau et les résultats obtenus.

4.1 Structure choisie

Ce matériau sera constitué de fibres de PLA électrofilées avec les paramètres optimisés trouvés dans une étude préalable [108]. Cette étude a été réalisée sur le même montage d'électrofilage. Les matériaux utilisés viennent des mêmes manufacturiers et ont les mêmes spécifications. Des nBGseront ajoutées à la solution d'électrofilage.

Tableau 4.1 Paramètres d'électrofilage du PLA (reproduit et traduit depuis [108])

Concentration en polymère de la solution (%w/v)	Taille de l'aiguille (G)	Distance (cm)	Tension (kV)	Débit (ml/h)	Vélocité du mandrin (RPM)	Taille des fibres
14	26	20	22	0.6	25	273±30 nm
16	21	15	20	1.6	25	730±75 nm
19	18	15	20	1.5	25	1.47±0.2 µm

4.2 Matériaux et méthodes

Dans un premier temps, des fibres de PLA pur ont été produites à des fins d'entraînement. Par la suite, des nanoparticules ont été ajoutées à la solution d'électrofilage afin de les incorporer aux fibres. Une diminution de viscosité au cours du temps de mélange a démontré que les nanoparticules catalysaient l'hydrolyse du PLA en solution. La viscosité de la solution diminuant dans le temps, le procédé d'électrofilage devenait instable, voire destructeur, à cause de la pulvérisation provoquée par la chute de viscosité. Une nouvelle méthodologie de mélange a dû être mise au point pour limiter le temps de contact entre le PLA et les nanoparticules de verre en solution.

Une caractérisation par analyse thermogravimétrique (TGA) a permis de mesurer le taux de nanoparticules présent en pratique dans les nanofibres. Un test de traction a permis de mesurer l'impact de la quantité de nanoparticules sur les capacités mécaniques du matériau. Une prise d'image des fibres par SEM suivie par une analyse à l'aide du logiciel ImageJ nous a permis de mesurer la taille des fibres et d'évaluer leur diamètre.

Un ensemencement de cellules L929 sur les fibres suivies par des tests de coloration permet de mesurer la viabilité et la prolifération cellulaire sur ces fibres en fonction du contenu en nanoparticules. L'effet antibactérien contre *E.Coli* est ensuite mesuré en laissant reposer le matériau dans une suspension de bactéries Gram-négatif.

Finalement, une culture de cellules L929 est faite sur ces fibres, le surnageant est prélevé et envoyé à Eve Technologies afin de titrer la concentration de différents facteurs proangiogéniques. Cet essai permet de mesurer le potentiel proangiogénique du matériau.

4.2.1 Matériaux

Le PLA est fourni par NatureWorks sous la référence 4032D (densité de 1.24g/cc), le 2,2,2-Trifluoroéthanol (TFE) est fourni par Sigma. Les nBG sont fournies par Nano Research Elements (45S5, purity 99.9%, <500 nm).

4.2.2 Électrofilage

Dans un premier temps, une reproduction du matériau développé dans l'étude de référence a été menée afin de s'habituer à la manipulation du matériau. Dans un second temps, les nBG ont été ajoutés à la solution d'électrofilage et le processus de mélange a été raffiné pour obtenir la teneur en nanoparticules la plus élevée possible dans les fibres.

hydrolyse du PLA

Le PLA a été dissout dans du TFE selon les paramètres cités dans le tableau 4.1. Afin de gagner du temps et vu la disponibilité d'une aiguille G18, les paramètres choisis ont été ceux de la 3e ligne. Un tapis de fibres facilement manipulable a été obtenu en résultat.

Par la suite, des nanoparticules de verre ont été ajoutées à la solution suite à la dissolution du PLA (5%wt par rapport au PLA) et pour obtenir une dispersion optimale, la solution a été soniquée dans un bain à ultrasons pendant une heure. Il a été remarqué de façon empirique que la viscosité de la solution avait diminué, et que le processus d'électrofilage, stable auparavant, était maintenant instable avec des projections de gouttelettes sur le matériau.

Un phénomène similaire a déjà été observé auparavant dans le cas du PLA dissous dans du TFE en présence de nanoparticules d'oxyde de zinc [109]. Dans ces travaux, il a été constaté que la présence de nanoparticules de zinc dans une solution de PLA et de TFE diminuait significativement la viscosité de la solution et que la cause était l'hydrolyse des chaînes de PLA, diminuant le poids moléculaire moyen du PLA dans la solution. Cette diminution de viscosité altérait les résultats de l'électrofilage, rendant les fibres plus fines. Il est possible d'utiliser un autre solvant, une solution de chloroforme, de PLA et de nanoparticules de zinc restant stable dans le temps, ou d'utiliser de faibles teneurs en nanoparticules pour empêcher ou limiter cette hydrolyse.

L'hydrolyse du PLA est un phénomène parasite pour nos expériences. La diminution de viscosité de la solution d'électrofilage rend le processus instable et donc sujet à la projection de gouttelettes de solution sur le collecteur, ce qui détruit les fibres présentes sur ce dernier. Les nBG sédimentent aussi plus rapidement, ce qui diminue le contenu en nBG des fibres créées par électrofilage. Cependant, diminuer le contenu en nBG diminuerait aussi le potentiel thérapeutique du matériau. Utiliser un solvant différent demanderait de passer un temps important à optimiser le processus d'électrofilage, ce qui n'était pas possible à ce stade de la maîtrise. Il a donc été choisi de limiter au maximum le temps que le PLA passait en contact avec les nBG en solution pour que le processus d'électrofilage soit le plus stable possible et que le contenu en nBG soit le plus élevé possible.

Dans un premier temps, il a été tenté de limiter le temps de mélange de la solution d'électrofilage à 10 minutes après l'ajout de 5%wt. de nBG à une solution de 19%wt/v de PLA et de TFE. L'électrofilage est resté stable pendant plus d'une heure. Cependant, une analyse SEM a montré la présence d'amas de nBG (voir figure 4.1), la dispersion des nanoparticules n'était donc pas optimale.

Une analyse par TGA (TGA Q500, TA Instruments) a été utilisée pour déterminer le contenu

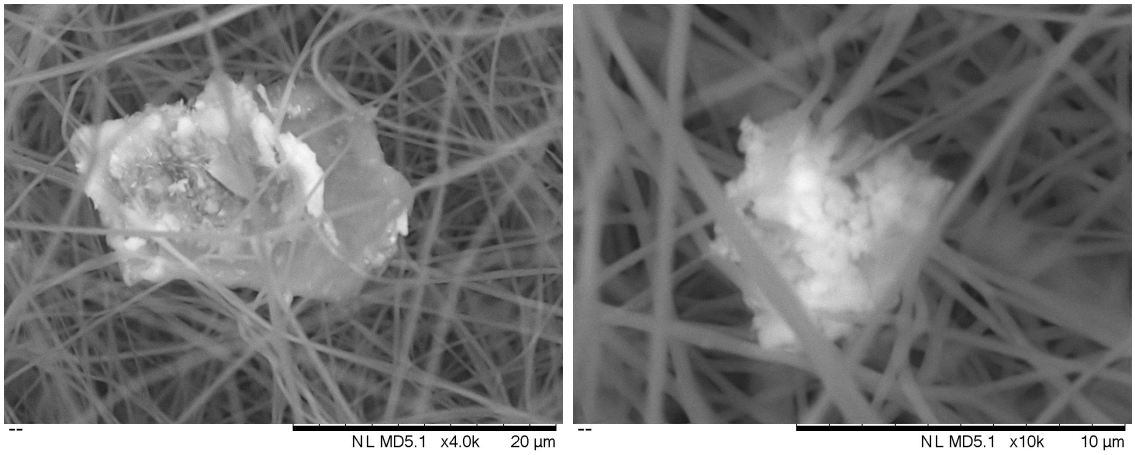


FIGURE 4.1 Amas de nanoparticules de verre dans des fibres de PLA après un mélange de 10 minutes

en nBG des fibres obtenues. Le contenu en nBG est défini comme le poids restant à 800 °C, température à laquelle le PLA a presque entièrement brûlé. Le contenu constaté était alors d'environ 1%, ce qui suggère que 80% des nBG ne sont pas électrofilées. Considérant le court temps de mélange de la solution d'électrofilage, la dispersion des nanoparticules est faible avec la présence d'amas qui sédimentent rapidement, les nanoparticules n'arrivent donc pas au bout de la seringue et ne sont pas électrofilées avec le PLA. La taille des fibres a été évaluée au SEM, et il a été constaté que la présence de nBG diminue le diamètre moyen des fibres de PLA comparé à des fibres de PLA pur. Le diamètre des fibres de PLA pur était autour de 0.6-1µm alors que celui des fibres contenant du verre bioactif était autour de 320-340 nm (voir figure A.5). Selon la littérature, l'ajout de nBG amène généralement au résultat inverse, les fibres contenant de plus grandes proportions de nBG devenant en moyenne plus épaisses et avec une distribution de taille moins uniforme [110–112]. Ce résultat peut être attribué à la diminution de viscosité résultant de l'hydrolyse du PLA et donc de la diminution du poids moléculaire moyen dans la solution.

Afin d'améliorer la dispersion des nBG dans la solution d'électrofilage, deux solutions mères ont été créées puis mélangées pour obtenir la solution d'électrofilage. Une solution de PLA et de TFE à 23,7%wt/v et une solution de nBG et de TFE à 4,75%(wt/v) sont donc préparées séparément. Les solutions sont vigoureusement mélangées à l'aide d'un mélangeur magnétique au cours d'une nuit, puis la solution de nBG est soniquée pendant 30 minutes à l'aide d'un bain à ultrasons. Les solutions sont mélangées au ratio 4 :1 (PLA : nBG, V : V) pendant 5 minutes à l'aide d'un mélangeur à ultrasons pour créer la solution d'électrofilage. Cette solution est ensuite électrofilée pendant 1 h 30. Cette solution a permis d'obtenir des fibres,

mais il a été remarqué qu'un dépôt de poudre blanche était présent dans la seringue à la fin du processus d'électrofilage. Le contenu en nBG de ces fibres a été évalué par analyse TGA. Le contenu en fin de test était de 1,7% (voir figure A.5), bien que ce soit plus que précédemment (1%), 60% du contenu en nanoparticules n'était pas intégré aux fibres, ce qui n'est pas satisfaisant.

Le dépôt de poudre blanche dans la seringue est du nBG ayant sédimenté lors du processus d'électrofilage. Ce nBG ne peut donc pas être intégré aux fibres, ce qui explique le faible contenu en nanoparticules. Pour contrer cette sédimentation, le processus d'électrofilage doit être suffisamment court. Il a donc été décidé que la solution d'électrofilage précédemment décrite soit électrofilée pendant 2 segments de 45 minutes plutôt qu'en 1 seul segment de 1 h 30. Une solution d'électrofilage étant préparée en dernière minute pour chaque segment. Cette méthode a permis d'obtenir un électrofilage stable et une analyse TGA a permis de déterminer que le contenu en nBG était supérieur à 4,5%. 90% du verre bioactif était intégré aux fibres produites. Ce qui est satisfaisant.

Un pourcentage de nBG plus élevé (10%wt) a été tenté en utilisant une méthode similaire. La diminution de viscosité était encore plus rapide, ce qui a donné lieu lors de l'électrofilage à de la pulvérisation de solution en seulement quelques minutes. Les fibres produites n'ont alors pas pu être séparées du collecteur. Des fibres ne pouvant pas être manipulées étant impossibles à tester, 5%wt de nBG a été considéré comme le maximum atteignable dans la solution de PLA en utilisant le TFE comme solvant. La seule solution pour intégrer plus de nBG aurait été d'utiliser un autre solvant, mais la revue de littérature et l'optimisation du processus d'électrofilage n'était pas envisageable avec le temps restant pour finir la maîtrise. Il a donc été décidé que seules deux conditions seraient testées pour l'échafaudage. La première contiendrait uniquement du PLA, et la seconde du PLA avec 5%wt de nBG.

4.2.3 Analyse thermogravimétrique

La sédimentation des nBG au cours du processus d'électrofilage limite l'incorporation de la totalité des nBG dans les fibres de PLA produites. La méthode d'électrofilage a donc été adaptée afin de limiter cette sédimentation. Les solutions de PLA et de TFE et celles de nBG et de TFE sont préparées 24h avant l'électrofilage et vigoureusement mélangées avec un mélangeur magnétique. La solution nBG-TFE est ensuite soniquée pendant 1h avant de mélanger vigoureusement les solutions PLA-TFE et nBG-TFE à un ratio 4 : 1 (PLA : nBG, V : V) pendant 5 minutes. La solution obtenue est ensuite électrofilée sur un intervalle de 45 minutes. Une solution fraiche est nécessaire pour chaque session d'électrofilage. Une analyse thermogravimétrique permet de confirmer la teneur en verre bioactif.

4.2.4 Analyse SEM

Le diamètre des fibres produites par électrofilage est un important facteur de la viabilité des cellules ensemencées sur le matériau. Des fibres plus fines permettent une meilleure imitation de la MEC et permettent d'offrir un environnement adapté aux cellules. L'infiltration cellulaire est aussi conditionnée par la taille des pores entre les fibres. Les nBG réduisent la viscosité de la solution de PLA et de TFE, et produisent des fibres plus fines, comme mentionné plus haut. Une analyse SEM est un moyen de mesurer la taille des fibres et d'examiner leur morphologie. Une analyse similaire peut être utilisée pour caractériser les nBG fournies par Nano Research Elements afin d'évaluer la taille des nanoparticules.

Un échantillon de matériau est analysé au SEM. 5 images sont prises à des emplacements aléatoires dans le matériau, et 10 mesures de diamètre de fibres sont réalisées sur chacune des images à l'aide du programme ImageJ. Des nBG sont étalées puis analysées au SEM, le programme ImageJ est aussi utilisées pour mesurer la taille de ces nanoparticules.

4.2.5 Test de traction

Le changement de la morphologie et de la taille des fibres provoque des changements des propriétés mécanique dans ces dernières. Un test de traction permet de mesurer ce changement de comportement.

Des échantillons de PLA et de PLA-nBG sont préparés à l'aide d'un punch permettant de préparer une bandelette d'exactement 3mm de large et de 3,8cm de long. L'épaisseur de l'échantillon est évalué en mesurant à 5 reprises l'épaisseur des fibres directement présentes sous l'emplacement ou la bandelette a été prélevée. Les bandelettes sont ensuite soumises à une traction jusqu'à rupture. La traction est fournie par un testeur mécanique Mach-1 V500 (Biomomentum). La force appliquée en fonction de l'élongation est mesurée.

4.2.6 Prolifération et viabilités de cellules de mammifère

Un échafaudage cellulaire pour une plaie diabétique doit pouvoir soutenir la prolifération cellulaire pour que les cellules puissent le coloniser et qu'il offre un soutien aux nouveaux tissus de réparation. Par conséquent il doit aussi assurer une viabilité maximale aux cellules présentes. Cette section présente les tests de prolifération, de viabilité cellulaire et de cytotoxicité réalisés sur les fibres de PLA et de nBG. L'essai de prolifération est basé sur l'utilisation de colorant PrestoBlue HS (Invitrogen) et les essais de viabilité et de cytotoxicité sont réalisés à l'aide du kit LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (488/570) (Invitrogen). Les effets des échafaudages sur les cellules ensemencées sont évalués après 24 h, 72 h et 168 h (7 jours)

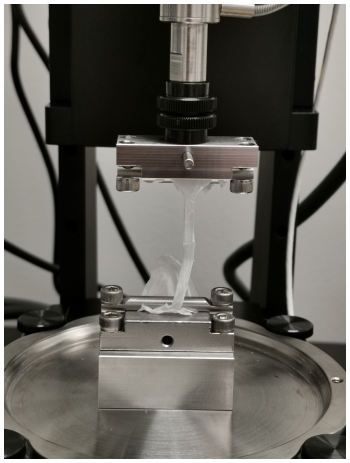


FIGURE 4.2 Placement de l'échantillon au repos avant un test de traction sur le testeur mécanique Mach1 V500

à l'aide de ces colorants.

Les fibroblastes sont les cellules les plus abondantes dans le derme et sont les productrices de nouveaux tissus. Durant nos études, nous avons utilisé des cellules de la lignée L929, des fibroblastes de souris initialement tirés de tissus sous-cutanés. Ces cellules ont été maintenues à l'aide d'un milieu de culture constitué de milieu de culture essentiel alpha (MEM-α) supplémenté avec 10% de sérum fétal bovin (FBS).

Des échantillons des matériaux (PLA-0,5%nBG) sont plongés dans de l'isopropanol (70%) pendant 5 minutes puis dans du milieu de culture supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine (pen-strep) afin de décontaminer et humidifier le matériau. Cette étape a aussi pour intérêt de rendre le matériau plus facilement manipulable, les fibres de PLA et de nBG sont statiquement chargées, ce qui rend leur manipulation et leur placement en multiplaque difficiles.

À la suite à cette humidification, des échantillons des matériaux sont punchés à l'aide de punchs de biopsie de 6 mm (Militex), rincés 3 fois dans du DPBS/pen-strep frais avant d'être déposé dans un puits libre sur une multiplaque de 96 puits. Un échantillon sur deux pour chaque condition est ensemencé avec 10^4 cellules L929. Ils sont ensuite recouverts de milieu de culture supplémenté avec 1% de pen-strep. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 24 h à 37 °C, 5%CO2. Les échantillons non ensemencés sont utilisés comme contrôles négatifs et permettent de vérifier si les échafaudages montrent une fluorescence en présence de colorants, même sans la présence de cellules à leur surface.

Décontamination du matériau

L'électrofilage ne se fait pas dans un milieu stérile, le matériau doit donc être décontaminé avant de pouvoir être ensemencé avec des cellules L929. Plusieurs options sont possibles, notamment l'exposition aux rayons UV, la plongée dans de l'éthanol ou de l'isopropanol, ou l'utilisation d'un antibiotique dans le milieu de culture afin de diminuer le risque de développement bactérien. Il a été rapidement remarqué que le matériau était difficilement manipulable à cause de son électrostaticité. Le matériau a été plongé dans du milieu de culture supplémenté avec du pen-strep et du tampon phosphate de Dulbecco (DPBS) supplémenté avec du pen-strep pendant 24 h afin de l'humidifier et le rendre plus facilement manipulable. Après 24 h, le matériau plongé dans du milieu de culture avait en grande partie absorbé du liquide, mais environ 40 à 50% du matériau était resté sec et flottait à la surface du milieu de culture. Le matériau plongé dans le DPBS était resté complètement sec et flottait en surface. Ce résultat n'était pas satisfaisant pour la manipulation du matériau.

L'aspersion d'isopropanol à 70% a permis d'humidifier instantanément le matériau et de rendre sa manipulation plus facile. Cependant, des échantillons immergés plus d'une heure présentaient une diminution de leur surface. L'éthanol et l'isopropanol provoquent en effet la cristallisation du PVA, normalement amorphe, à température ambiante, mais augmente sa capacité à absorber du liquide [113]. Une étude sur la décontamination par éthanol de fibres de PLA électrofilées a démontré que cette cristallisation modifie les propriétés mécaniques et le comportement de cellules H9c2 sur le matériau [114]. Notamment en diminuant la pénétration des cellules dans le matériau.

Les avantages liés à une décontamination rapide par isopropanol suivi par un rinçage avec milieu de culture supplémenté avec du pen-strep permettent d'économiser du temps pour la préparation des expériences tout en limitant les possibilités de contamination. À l'aide de la littérature adéquate, il a été jugé que l'impact de 5 minutes de traitement par isopropanol n'altèrerait pas de manière significative ses effets [114].

Test de prolifération avec PrestoBlue HS

Le PrestoBlue HS (Invitrogen) est un colorant composé de résazurine, une molécule non fluorescente. Cette molécule est convertie en résorufine par l'environnement réducteur créé par une cellule saine. La résorufine est fluorescente et émet une lumière rouge (580-610 nm) lorsqu'elle est excitée avec une lumière de longueur d'onde plus faible (540-570 nm). Plus une cellule est en bonne santé, plus elle convertira une grande quantité de résazurine en résorufine et plus l'intensité de la fluorescence sera forte. Les cellules mortes ne participent

pas à cette conversion. L'intensité de la fluorescence émise par une colonie de cellules colorées au PrestoBlue est donc une mesure de leur viabilité et de leur prolifération. La variante « HS » pour « High Sensitivity » du PrestoBlue est une version hautement purifiée du PrestoBlue pour éviter la pollution en résorufine qui se produit naturellement lors de la production. Cette version permet de diminuer la fluorescence de fond du colorant et d'augmenter le ratio signal : bruit.

Les échantillons précédemment cités sont placés dans une multiplaque de 96 puits et recouverts de milieu de culture/pen-strep. Pour rappel, seule la moitié des échantillons est ensemencée avec 10^4 cellules L929, les échantillons non ensemencés permettent de mesurer la fluorescence due au matériau. Un puits rempli uniquement de milieu de culture/pen-strep est utilisé comme contrôle négatif et comme blanc lors de l'analyse de la multiplaque. Un puits ensemencé avec 10^4 cellules L929 sert de contrôle positif. La multiplaque est ensuite incubée à 37 °C, 5%CO2. Lorsqu'un point de temps est atteint, le colorant PrestoBlue est ajouté à hauteur de 10%(V) par puits. La multiplaque est ensuite incubée pendant une heure à 37 °C, 5%CO2 avant d'être analysée avec un lecteur de multiplaques en fluorescence. Le colorant est excité par une lumière de longueur d'onde 560 nm et l'émission est mesurée à 590 nm selon les recommandations du fabricant. L'intensité mesurée en émission est une mesure relative à la viabilité et la prolifération des cellules présentes. Le test est effectué en triplicata.

Après la mesure de la fluorescence relative à un gain de 100%, les échantillons de matériau sont rincés dans du DPBS/pen-strep, puis incubés dans du milieu de culture/pen-strep à 37 °C, 5% CO2 jusqu'au prochain point de temps.

Test de viabilité/cytotoxicité avec le LIVE/DEAD cell imaging kit

La viabilité et la toxicité du matériau ont été évaluées à l'aide du LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (Invitrogen). Ce kit est constitué de deux colorants, la calcéine-AM et le colorant DEAD RED. Le premier est une molécule qui est convertie en calcéine par les cellules vivantes et produit une fluorescence verte. Le second est converti en un agent fluorescent rouge au contact de cellules mortes. Ces deux colorants sont mélangés puis ajoutés au milieu de culture contenant des cellules. Un microscope à fluorescence permet ensuite de voir les cellules vivantes ou mortes à l'aide de filtres FITC ou Texas Red.

Les échantillons précédemment cités sont placés dans une multiplaque de 96 puits et recouverts de milieu de culture/pen-strep. Un puits contenant des cellules vivantes et en bonne santé sert de contrôle pour la coloration LIVE. Un puits contenant des cellules fixées à l'aide de formaldéhyde avant la coloration fournit un contrôle pour la coloration DEAD. Un volume égal de mélange de colorant est ajouté à chaque puits puis examiné au microscope confocal

à fluorescence (Olympus IX81). 4 images par condition sont prises. Le test est réalisé en triplicata.

4.2.7 Essai antibactérien

Une plaie est un point d'accès pour les bactéries, qui peuvent alors provoquer des infections. Ces infections ajoutent un fardeau bactérien à la guérison de la plaie et peuvent si elles progressent trop amener à des amputations. Idéalement un échafaudage cellulaire pour une plaie diabétique devrait avoir une activité antibactérienne pour prévenir les infections et limiter l'augmentation de ce fardeau bactérien.

L'activité antibactérienne du matériau est évaluée suivant la procédure décrite par ISO29743 sur la détermination de l'activité antibactérienne des produits textiles, due à la porosité des nanofibres. Une culture de bactéries Gram négatifs (*E.Coli*) est cultivée dans un milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C sous agitation à 110RPM jusqu'à atteindre une concentration de 10^8 bactéries par millilitres. Cette solution de bactéries est ensuite diluée à une concentration entre 10^6 et 10^7 bactéries par millilitres dans un milieu neutralisant (NB) pour stopper leur croissance. Des échantillons d'échafaudages de dimensions 3cm par 3cm sont découpés et décontaminés par 5 minutes d'immersion dans de l'éthanol à 70% avant d'être rincés avec du LB. Les échantillons sont ensuite plongés dans 5 ml de suspension de bactérie puis incubés pendant 24h à 37°C, 5%CO2. Cette suspension est ensuite diluée, puis inoculée sur des pétris remplis d'agarose. Suite à 24h de culture à 37°C, 5%CO2 de ces pétris, les colonies de bactéries formées sont comptées afin de déterminer la concentration en unités formatrice de colonies (CFU) de la suspension de bactéries. Les résultats obtenus sur le matériau antibactérien (PLA-nBG) sont ensuite comparés à ceux obtenus sur le matériau contrôle (PLA). Le test est effectué en triplicata.

4.2.8 Productions de facteurs proangiogéniques et quantification d'ADN par coloration PicoGreen

Une plaie diabétique est en partie caractérisée par un manque de perfusion sanguine dans la plaie. La glycation de certaines protéines et la suractivité immunitaire limitent la production de nouveaux capillaires sanguins, nécessaire à la production du tissu de granulation, la résolution de l'inflammation et le début de la phase de prolifération. L'intérêt porté au verre bioactif tient en grande partie à son potentiel proangiogénique. La formation des vaisseaux sanguins suit les gradients d'hypoxie et de concentration en VEGF. L'augmentation de production de facteurs proangiogéniques comme le VEGF et d'autres facteurs de croissance par les fibroblastes d'une plaie est un indicateur d'un effet proangiogénique.

10 000 cellules L929 sont ensemencées sur des échantillons de matériau. Après 72 h, puis 7 jours, le milieu de culture est prélevé, puis centrifugé à 30 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est prélevé puis stocké dans des cryotubes, congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80 °C. Le surnageant est ensuite envoyé à Eve Technologies qui titre la concentration en 16 facteurs proangiogéniques différents. Les échafaudages sont ensuite disposés dans des cryotubes et conservés à -80 °C.

Afin de normaliser les résultats, la quantité d'ADN présente dans les échafaudages au jour 3 et au jour 7 sont mesurés. Cela permettra de mesurer la quantité de VEGF produites par gramme d'ADN. L'ADN est donc extrait des échafaudages, puis mis en contact avec le colorant PicoGreen, qui devient fluorescent en présence d'ADN. Pour obtenir la quantité d'ADN présente dans les échafaudages, ces derniers sont placés dans une fiole, digérés dans une solution de papaïne puis centrifugés. Le surnageant est prélevé et disposé dans les puits d'une multiplaque de 96 puits. Des solutions standard à une concentration de 0,5, 2, 4, 6, 10 et 12,5 µg/ml d'ADN. Les solutions sont colorées à l'aide de PicoGreen, puis leur fluorescence (excitation à 480 nm, émission à 520 nm) est mesurée. La fluorescence des standards d'ADN suit une évolution linéaire dont l'équation peut être calculée par régression linéaire. Cette équation est ensuite utilisée pour calculer la concentration d'ADN présente dans le surnageant récupéré.

4.3 Résultats

4.3.1 Morphologie des nBG

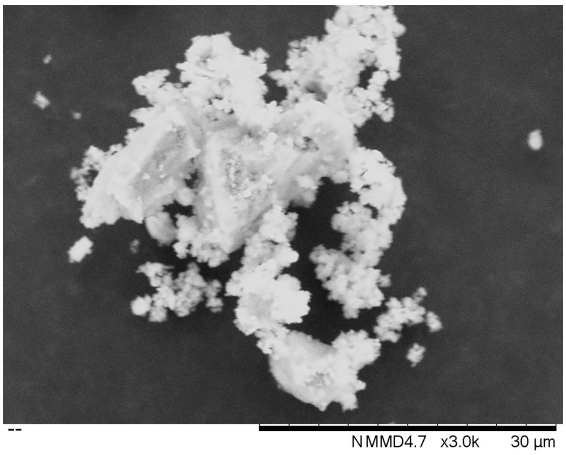


FIGURE 4.3 Images SEM d'un amas de nBG

Les nBG observées au SEM sont présentées à la figure 4.3. Les nBG sont de formes sphériques

et ont tendances à se regrouper en amas. Leur taille est de $168 \pm 34nm$ de diamètre.

4.3.2 Morphologie et caractéristique mécanique des fibres

La morphologie et la taille des fibres produites par électrofilage sont évaluées à l'aide de microscopie électronique et d'analyse à l'aide du logiciel ImageJ. L'effet des changements de morphologie sur la caractéristique mécanique des fibres est évalué par un test de traction.

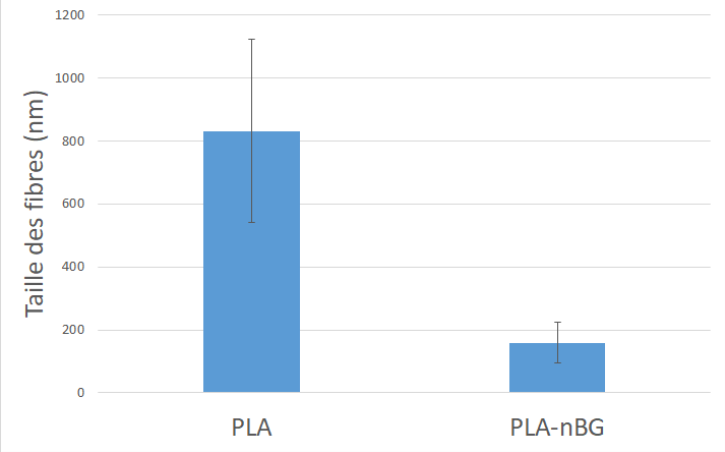


FIGURE 4.4 Taille des fibres produites

Les mesures liées à la taille des fibres sont présentées à la figure 4.4. Les fibres de PLA pur sont significativement plus larges que celles de PLA-nBG. Le diamètre des fibres de PLA varie autour de 0,6-1.1 µm alors que celui des fibres de PLA-nBG est autour de 100-250 nm.

Des images des fibres sont présentées à la figure 4.5. Les fibres de PLA sont uniformes dans leur morphologie alors que les fibres de PLA-nBG présentent des variations de diamètre et des billes. Il est difficile de savoir si ces billes se sont formées spontanément à cause des variations de viscosité dans la solution d'électrofilage, ou s'il s'agit de nBG qui ont été incorporées dans les fibres.

La rupture des fibres de PLA suivait une évolution différente de celles de PLA-nBG. Dans le cas du PLA, présenté sur la figure 4.6, on remarque une première étape de déformation élastique suivie par une seconde phase avec une importante élongation, jusqu'à la rupture. La rupture n'est pas abrupte, mais progressive au fur et à mesure que l'élongation augmente. Ces évolutions lentes peuvent être expliquées par la structure fibreuse du matériau. Après la déformation élastique, les fibres s'alignent en réponse à l'élongation et la contrainte augmente. La rupture se fait fibre par fibre jusqu'à être complète.

Le PLA-nBG s'est comporté de façon différente, les résultats sont présentés à la figure **??**.

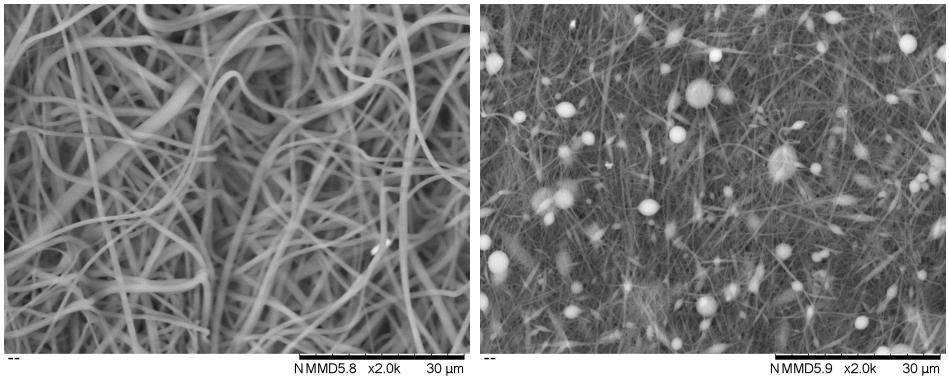


FIGURE 4.5 Images SEM de fibres de PLA (à gauche) et de PLA-nBG (à droite)

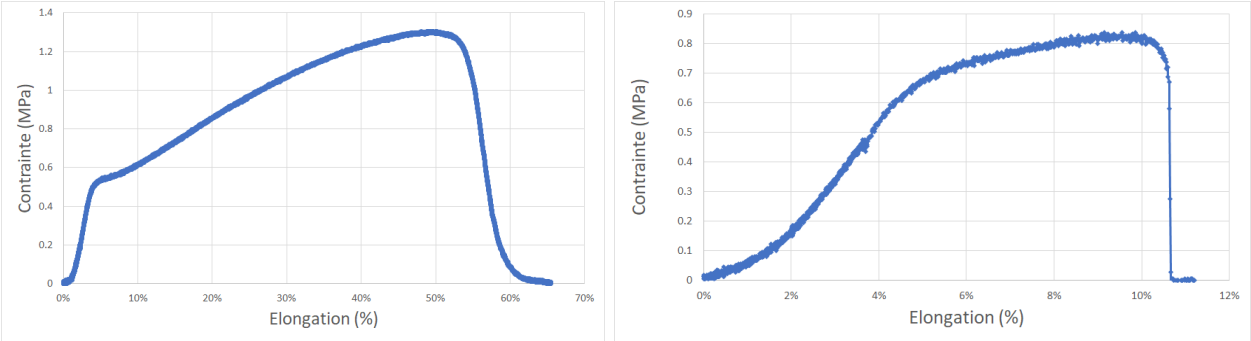


FIGURE 4.6 Test de traction du PLA (à gauche) et du PLA-nBG (à droite)

Après une phase de déformation élastique, il est passé à une phase de déformation plastique courte avant de rompre subitement. Il n'y a donc pas de phase d'alignement des fibres ou de rupture progressive de ces dernières. Les nanoparticules semblent modifier les propriétés mécaniques de l'échafaudage en créant notamment des points de concentration des fibres et en réduisant leur mobilité.

En superposant les courbes de traction des deux matériaux, on peut constater que la déformation élastique suit une progression semblable pour les deux matériaux. Cependant, la limite d'élasticité se situe à une valeur plus élevée pour le PLA-nBG, 0,7 MPa contre 0,5 MPa pour le PLA. Les rigidités du PLA et du PLA-nBG sont proches, 19 MPa pour le PLA et 17,6 MPa pour le PLA-nBG.

Les nBG ont peu d'influence sur la rigidité du matériau, mais limitent la mobilité des fibres en les empêchant de s'aligner selon la contrainte. La rupture plus rapide dans le cas du PLA-nBG pourrait être expliquée par le fait que les contraintes se concentrent aux points de jonction des fibres, qui sont dans la plupart des cas occupés par des nBG. Les contraintes pourraient donc donner lieu à des délaminations entre les fibres de PLA et les nBG et donc une rupture

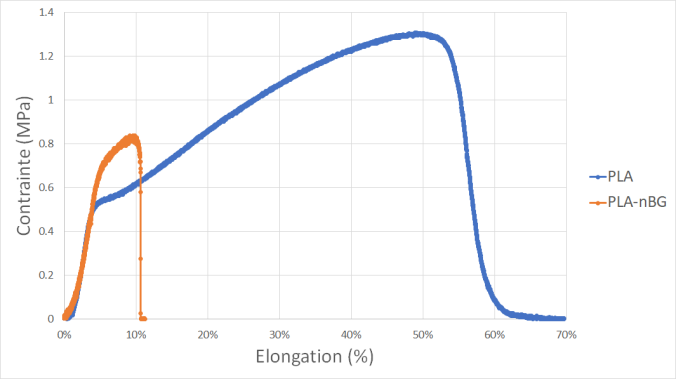


FIGURE 4.7 Comparaison des courbes de traction des fibres de PLA et de PLA-nBG

plus rapide que si le point de jonction était uniquement constitué de PLA expliquant la rupture plus rapide.

4.3.3 Prolifération et viabilité de cellules mammifères

Des cellules L929 ont été ensemencées sur des échafaudages de PLA et de PLA-nBG. Leur prolifération a été mesurée par une coloration avec le colorant PrestoBlue HS (Invitrogen). Leur viabilité a été évaluée par coloration avec le LIVE/DEAD Cell Imaging Kit puis observation par microscopie confocale à fluorescence.

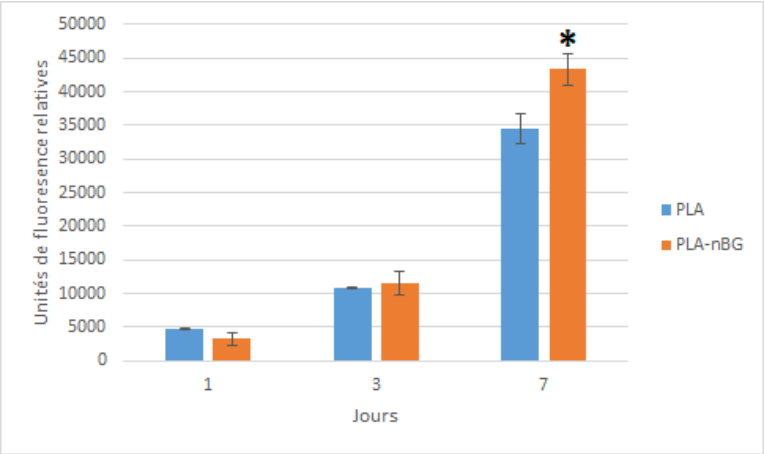


FIGURE 4.8 Fluorescence mesurée après 1, 3 et 7 jours de culture après une coloration PrestoBlue (* signifie que $p<0.05$). Expériences réalisées en triplicata

Les résultats sont présentés à la figure 4.8. Au jour 1 et au jour 3, les différences de fluorescence étaient insignifiantes statistiquement. Au jour 7, la fluorescence émise par les cellules colorées sur le PLA-nBG était significativement plus grande que celle émise par les cellules sur le PLA

pur. Le PLA-nBG améliore donc la prolifération des cellules L929 comparé au PLA, mais cette action met du temps à se manifester. Le mécanisme d'action du verre bioactif est lié à la diffusion d'ions thérapeutiques, qui est un mécanisme lent, plus de temps pourrait être nécessaire à l'installation de ses effets.

Les mesures de fluorescence sur le PLA-nBG montrent aux jours 1 et aux jours 3 une erreur type plus importante que pour le PLA. Cela pourrait être dû à la variation de l'efficacité de l'ensemencement de cellules dans le matériau. L'échafaudage en PLA a des fibres plus épaisses favorisant une plus grande taille de pore que le PLA-nBG, ce qui lui donne une meilleure faculté d'absorption de la suspension de cellules que le PLA-nBG. Plus de cellules L929 pourraient donc être présentes dans l'échafaudage que pour le PLA-nBG. Il est aussi important de noter que lors des expériences, la manipulation du PLA-nBG a été difficile. Même après humidification, le matériau avait tendance à se plier et à flotter dans les puits lors de son incubation, et cela peut avoir impacté la prolifération et la viabilité des cellules ensemencées.

Les tests de viabilité se sont passés comme prévu, les contrôles vivants et morts montraient les résultats attendus. Des exemples sont présentés à la figure 4.9. La coloration verte tache les cellules vivantes, et la coloration rouge tache les cellules mortes. La coloration rouge est très sélective et colore uniquement les cellules mortes. La coloration verte montre une différence d'intensité marquée entre les cellules vivantes, qui sont uniformément colorées, et les cellules mortes, avec une luminosité plus faible et une coloration plus fragmentée.

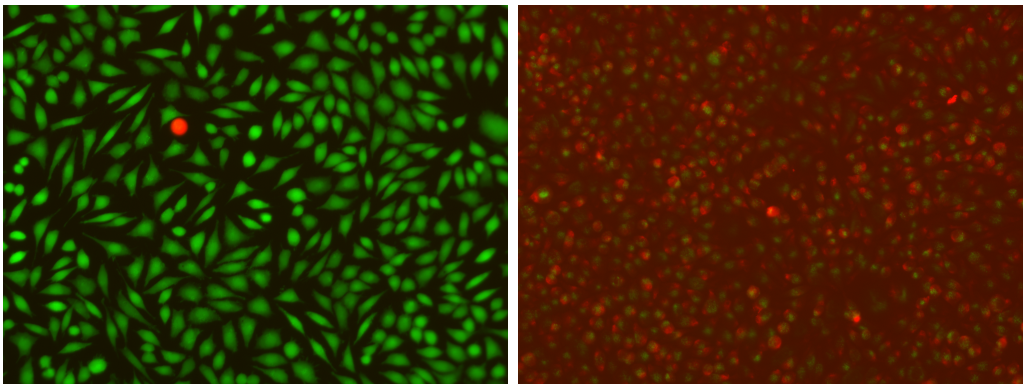


FIGURE 4.9 Contrôles du test LIVE/DEAD observés à l'aide du microscope à fluorescence EVOS M5000, les cellules vivantes sont en vert, et les cellules mortes sont en rouge

Durant les tests de viabilité, il a été remarqué que l'échafaudage réagissait à la coloration rouge. Bien que cela soit parasite pour nos expériences, la différence entre les cellules mortes et l'échafaudage restait claire. Il n'a donc pas été décidé d'utiliser un autre mélange de colorants.

Les résultats sont présentés à la figure 4.10. Aux jours 1 et 3, les deux échafaudages présentent une viabilité égale, mais au jour 7, la viabilité des cellules ensemencées sur le PLA diminue rapidement. Trouver des zones avec des cellules vivantes a été difficile, la majorité des cellules visibles étant mortes sur cet échafaudage. Sur les échafaudages de PLA-nBG, une couche de cellules saines était présente sur la quasi-entièreté des échantillons. Trouver des cellules mortes sur ces échafaudages était alors presque impossible. Il est possible d'affirmer que la toxicité de l'échafaudage de PLA-nBG est moindre que celle de l'échafaudage de PLA, et que la viabilité des cellules est supérieure en présence de nBG.

4.3.4 Quantification d'ADN et production de facteurs proangiogéniques

Des cellules L929 ont été ensemencées sur des échafaudages de PLA et de PLA-nBG. Après 3 et 7 jours d'incubation, le surnageant et l'échafaudage sont prélevés. Le surnageant est centrifugé et envoyé à Eve Technologies pour titrage de la quantité de VEGF présente. Les échafaudages sont digérés à l'aide de papaïne et l'ADN présent en est extrait. La quantité d'ADN présente sur l'échafaudage est mesurée à l'aide d'un essai de coloration PicoGreen.

Les standards colorés par PicoGreen montrent une évolution linéaire des unités de fluorescence relatives (RFU) en fonction de la concentration d'ADN. Le résultat obtenu à 12,5 µg/ml a été écarté, car la linéarité diminuait s'il était inclus dans la courbe standard. La courbe standard obtenue et son équation sont présentées à la figure 4.11.

La quantité de solution d'ADN extrait des échafaudages et coloré a été ajustée afin que les fluorescences mesurées tombent dans la courbe standard. Les résultats mesurés pour les solutions d'ADN aux jours 7 sur le PLA et le PLA-nBG étaient en effet trop grands pour pouvoir être situés dans la zone de linéarité définie par la courbe standard. Ces solutions ont donc été diluées avant mesure pour être présentes dans la zone de linéarité.

En utilisant l'équation de la droite obtenue par régression linéaire, la masse d'ADN présente dans les échafaudages en fonction du temps peut être calculée. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.12.

En présumant que l'efficacité d'extraction est la même sur les deux échafaudages, ces résultats suggèrent que la masse d'ADN obtenue dans les échafaudages de PLA-nBG est plus grande que celle présente sur l'échafaudage de PLA pur au jour 3 et au jour 7. Le PLA-nBG améliore donc la prolifération des cellules L929 comparé au PLA pur.

La production de facteurs pro-angiogéniques n'a montré presque aucune différence statistique après 3 ou 7 jours de culture. Les deux seuls facteurs dont la concentration étaient augmentées sur le PLA-nBG étaient l'endogline et les PDGF Les niveaux de VEGF sont les mêmes entre

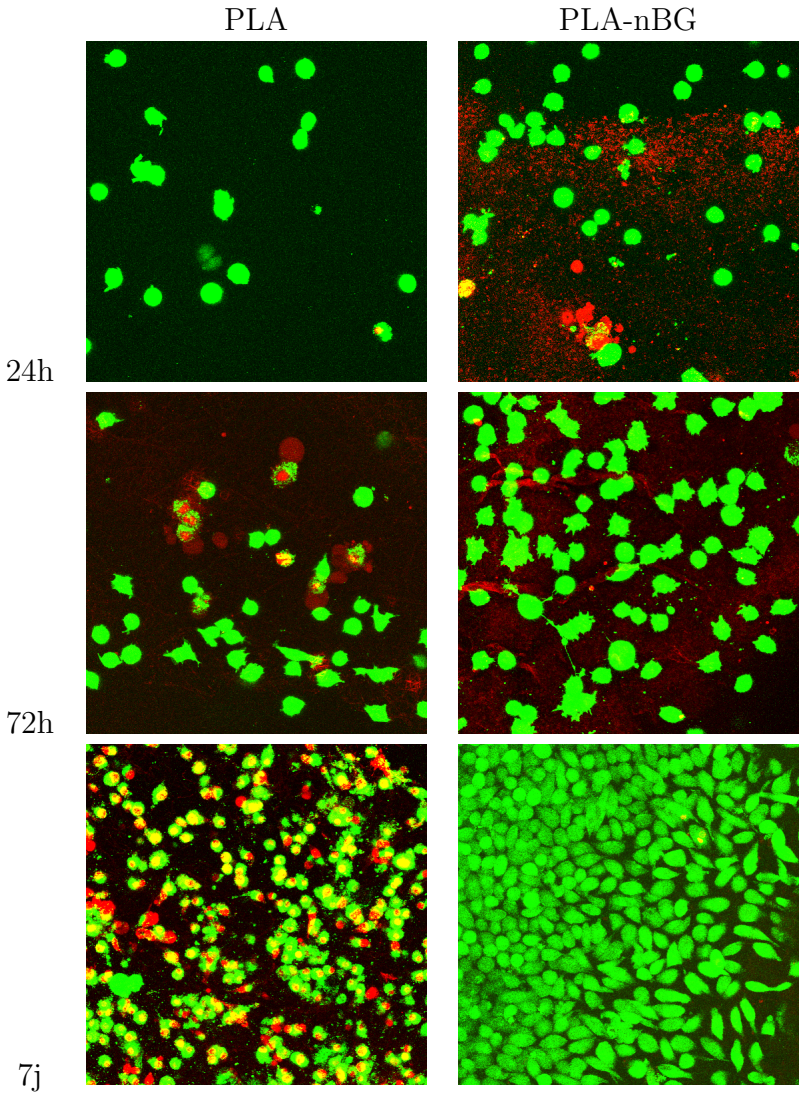


FIGURE 4.10 Imagerie des cellules sur les échafaudages de PLA et PLA-nBG à l'aide de la coloration LIVE/DEAD (projections sur l'axe Z)

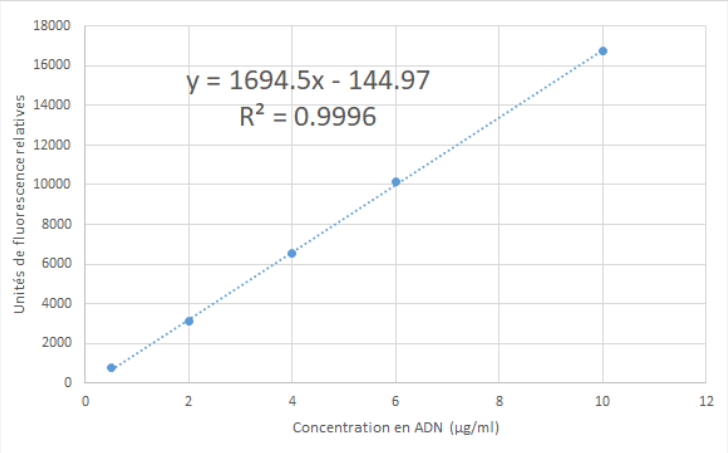


FIGURE 4.11 Courbe standard obtenue à partir des standards d'ADN

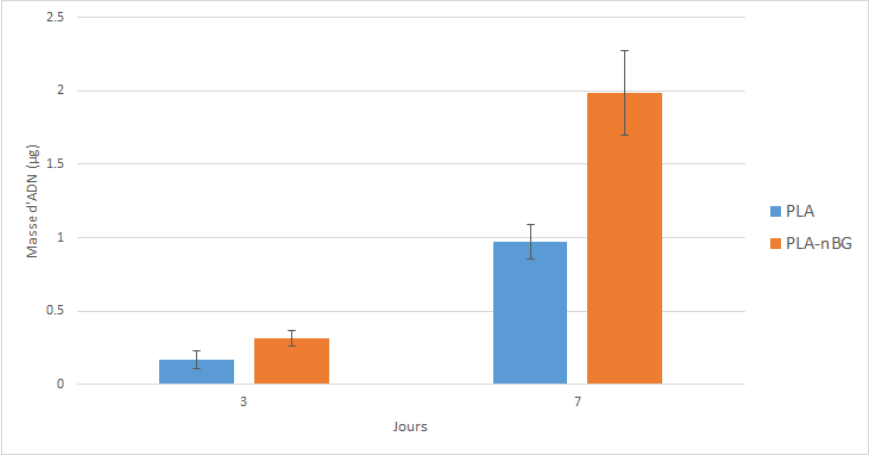


FIGURE 4.12 Masse d'ADN obtenue sur les échafaudages de PLA et PLA-nBG. Expérience réalisée en duplicata

les deux échantillons. Une grande partie des facteurs proangiogéniques étaient indétectables lors des mesures, ce qui peut être expliqué par le fait qu'ils ne sont pas produits par les fibroblastes pour une partie d'entre eux. Les résultats présentant des différences significatives sont présentés à la figure 4.13.

L'endogline est une protéine faisant parties des récepteurs de TGF-α. Son intérêt dans le cas de l'angiogénèse fait l'objet de recherches, mais peu de sources sont disponibles quand à son application dans le cadre des plaies diabétiques [115]. Le PLGF est un facteur de croissance proangiogénique dont l'insuffisance dans le cas de plaies diabétiques a été prouvé, et qui possède des capacités thérapeutiques intéressantes pour ces plaies [116, 117].

Une incohérence peut être constatée ici. Si les résultats sont normalisés selon la quantité

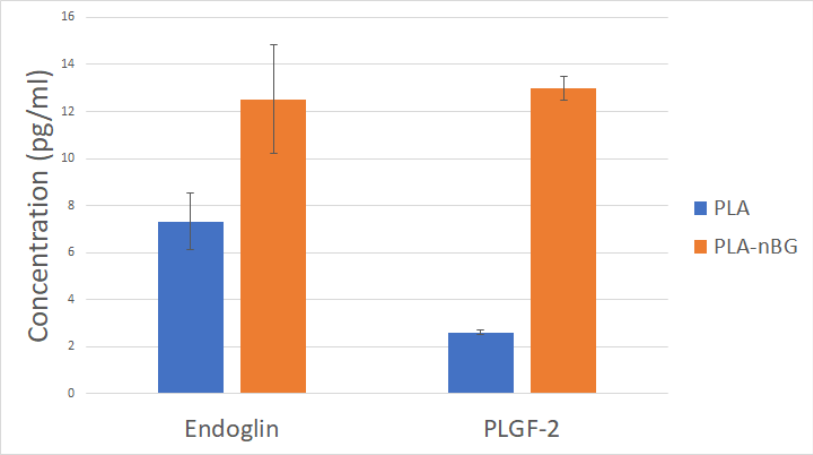


FIGURE 4.13 Concentrations en facteurs de croissance proangiogéniques après 7 jours de culture. Expérience réalisée en duplicata

d'ADN sur les échafaudages, les cellules sur l'échafaudage de PLA produisent deux fois plus de VEGF que les cellules présentes sur le PLA-nBG. Cette mesure va à l'encontre des résultats précédemment obtenus pour la prolifération et l'essai Live/Dead, qui montrent non-seulement une population plus important de cellules sur les échafaudages de PLA-nBG mais aussi un étalement plus important. Il est important de noter que cette expérience, concernant la quantification d'ADN sur l'échafaudage, ainsi que la production de facteurs proangiogéniques, est une expérience exploratoire qui n'a pas pu être répétée.

4.3.5 Effets antibactériens

Des suspensions de bactéries *E.Coli* ont été inoculées sur des échafaudages de PLA et de PLA-nBG. Suite à 24 h d'incubation, le nombre de bactéries vivantes sur les échafaudages a été mesuré afin de mesurer l'effet antibactérien de l'échafaudage de PLA-nBG comparé à l'échafaudage de PLA.

Les résultats n'ont montré aucune diminution significative du nombre de bactéries en présence de PLA-nBG comparé au PLA. Après comptage, les concentrations de bactéries moyennes mesurées étaient de $8.6 * 10^7$ CFU/ml pour le PLA et de $6.6 * 10^7$CFU/ml pour le PLA-nBG. Ces valeurs sont très proches de la concentration initiale de la suspension de bactérie dans laquelle les échantillons de matériau ont été plongés, aucun effet antibactérien prononcé n'est donc constaté.

La diminution de la concentration en CFU de la suspension de bactéries liée au PLA-nBG est statistiquement insignifiante, mais tout de même présente. L'effet antibactérien du verre

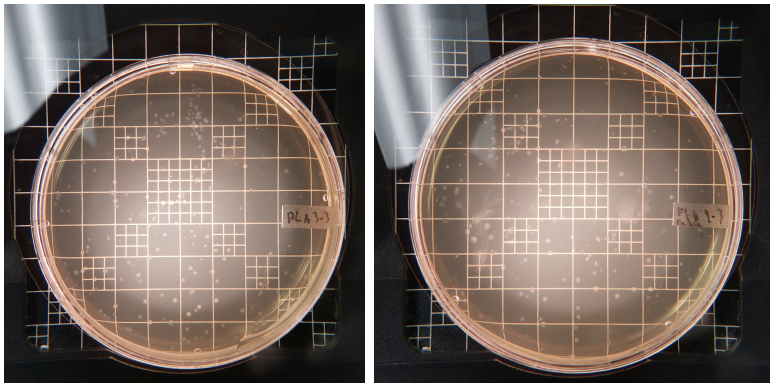


FIGURE 4.14 Pétris ensemencés avec des dillution x1000 des suspension de bactéries de PLA (à gauche) et PLA-nBG (à droite)

bioactif est lié à la diffusion de cations dans le milieu environnant, qui est un processus lent. Cette lenteur pourrait expliquer le faible effet antibactérien constaté après 24 h, car cette durée de temps pourrait être trop courte pour permettre à l'effet de ces ions de s'installer.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

Le but de ce projet était de produire un échafaudage cellulaire en fibres électrofilées dans le cadre de la guérison de plaies diabétiques. Dans ce but, deux matériaux ont été conçus. Le premier, constitué de PVA et d'alginate, a présenté trop d'obstacles à son utilisation, et a donc été abandonné. Le second, constitué de PLA et de nBG, a été produit et testé lors d'expériences *in vitro*. Dans ce chapitre, les résultats mentionnés dans les chapitres 3 et 4 feront l'objet d'une discussion.

5.1 Difficultés d'électrofilage du mélange de PVA et d'alginate

Des fibres de PVA et d'alginate ont été électrofilées, mais n'ont pas pu être amenées à un stade plus avancé d'expérimentation à cause de trop nombreux obstacles.

L'alginate n'est pas électrofilable seul à cause des charges négatives des chaînes en milieu aqueux, qui provoquent une répulsion électrostatique qui prévient la formation d'entrelacement nécessaire à l'électrofilage. Un polymère capable d'entrelacement et de former des liens hydrogène avec les molécules d'alginate peut être utilisé comme polymère porteur [88]. Dans cette étude, nous avons utilisé le PVA comme polymère porteur.

Dans la littérature, le PVA et l'alginate sont décrits comme synergiques en ce qui concerne leur utilisation dans la guérison des plaies. L'alginate et le PVA sont capables d'absorber les exsudats d'une plaie et de réguler son humidité [86]. L'alginate favorise la réépithélialisation [87]. Le PVA quant à lui possède une caractéristique mécanique très intéressante pour une plaie pour une plaie tout en gardant une excellente perméabilité à l'air [90]. Cependant, dans le cadre du processus d'électrofilage, les deux polymères sont antagonistes.

Le PVA apporte l'électrofilabilité à la solution d'électrofilage, mais l'ajout d'alginate la réduit, en augmentant significativement la viscosité de la solution. Cette augmentation de viscosité nécessite l'utilisation d'un champ électrique plus puissant, soit en réduisant la distance entre l'aiguille et le collecteur, soit en augmentant la tension utilisée. Bien que des fibres aient été obtenues à l'aide de PVA hydrolysé à 89%, il n'a pas été possible d'en obtenir sans pulvérisation dans le cas du PVA hydrolysé à 99%, et cela est dû au trop grand champ électrique nécessaire à la production de fibres. Il est probable que la diminution de distance ayant été nécessaire à l'obtention d'un processus stable ait limité l'évaporation du solvant entre l'aiguille et le collecteur, et soit donc en partie à l'origine de la difficulté de manipulation des fibres. Finalement, une solution plus visqueuse requiert un débit d'électrofilage plus lent,

et donc une déposition de fibre lente elle aussi. À la fin de l'étude, la déposition de fibres au cours de 8 heures d'électrofilage a été insuffisante à la production d'une couche de fibres maniable et donc testable.

L'électrofilage de PVA et d'alginate a été rapporté de multiples fois dans la littérature et est donc possible, mais le choix des matériaux utilisés est primordial pour la production de fibres utilisables. Un alginate de viscosité inférieure serait plus approprié à la production de fibres électrofilées.

5.2 Échafaudage de PLA et de nBG

5.2.1 Efficacité du matériau pour les blessures diabétiques

Des fibres de PLA et de nBG ont été produites avec succès, mais ont été impactées par l'hydrolyse du PLA dans la solution d'électrofilage. Une diminution de la viscosité a été constatée suite à l'ajout de nBG à la solution de PLA et de TFE, et des fibres de plus faible diamètre ont été produites en conséquence. La caractéristique mécanique de ces fibres a été établie à l'aide d'un test de traction. La contrainte à la rupture a été de 0,8 MPa dans le cas du PLA-nBG contre 1,2 MPa dans le cas du PLA, et l'élongation totale atteinte a été de 10% contre 50%. Les modules de Young des deux matériaux étaient de 17,6 MPa pour le PLA-nBG et de 19 MPa pour le PLA, montrant donc peu de différence. En l'état, il n'est pas possible de dire que les nBG ont amélioré les caractéristiques mécaniques du PLA, elles ont été limitées par l'ajout de nBG. Une analyse par TGA a permis de démontrer que les fibres produites contenaient jusqu'à 4,5% de nBG, et donc que 90% des nBG avaient été incorporées dans les fibres. À cause de l'hydrolyse du PLA dans le TFE en présence de nBG, il n'a pas été possible d'introduire plus de nBG dans le matériau.

La prolifération cellulaire après 7 jours était plus importante dans le cas du PLA-nBG que celui du PLA pur. La viabilité des cellules était aussi plus importante et leur morphologie montrait un plus grand étalement sur le PLA-nBG que sur le PLA pur. La production de facteurs proangiogénique par des fibroblastes de souris était plus importante sur des fibres de PLA-nBG que des fibres de PLA après 7 jours, les concentrations mesurées restent modestes, et la production de VEGF n'a pas subi de changement. La plupart des effets du PLA-nBG ont mis près d'une semaine à se manifester de façon significative. Cela pourrait être dû au mode d'action des nBG, la dissolution et diffusion de cations, qui est une méthode de délivrance lente, qui a besoin de temps avant d'atteindre des valeurs de concentrations suffisantes. Il est probable que sur une durée d'expérience plus longue, des différences de plus en plus significatives auraient pu être constatées. De plus grandes quantités de nBG dans le

matériau auraient aussi pu créer des différences significatives plus rapidement.

L'effet antibactérien du PLA-nBG est nul sur une durée de 24 h, bien que le BG 45S5 possède un léger effet antibactérien, ce dernier est en général assez faible [68, 111], d'où la nécessité de le doper à l'aide d'ions métalliques si l'effet antibactérien est le but recherché []. Un effet antibactérien est cependant un effet recherché pour la production d'échafaudages cellulaires destinés à des plaies diabétiques. Le matériau ne présente donc pas toutes les qualités nécessaires à une utilisation dans une plaie diabétique.

Le PLA-nBG a donc un potentiel proangiogénique et un intérêt pour la guérison des blessures des blessures diabétiques. Cependant des modifications et expériences supplémentaires sont nécessaires pour améliorer ce prototype à un niveau satisfaisant.

5.2.2 Infiltration cellulaire et limites des essais pratiqués

Les fibres électrofilées ont un intérêt pour le génie tissulaire grâce à leur capacité d'imitation de la MEC. Cette imitation est due d'une part à leur structure fibreuse et d'autre part à leur porosité. Il existe cependant une règle de pouce concernant les fibres électrofilées. Plus les fibres sont fines, plus le matériau est dense et donc plus la taille des pores diminue [118]. Des fibres plus fines créent une surface de contact plus élevée et améliorent l'adhérence cellulaire, des pores plus grands favorisent l'infiltration cellulaire.

Cette réalité peut être directement constatée dans le cas de cette étude. Pour le traitement des résultats des tests mécaniques, l'épaisseur des matériaux a été mesurée. Les fibres de PLA et de PLA-nBG sont produites de manière semblable et produisent des fibres sur des surfaces égales, pourtant les mesures d'épaisseur donnaient en moyenne 80 µm dans le cas du PLA contre 30 µm dans le cas du PLA-nBG pour une même zone sur le collecteur. Le PLA-nBG est donc plus dense que le PLA. Son apparence est plus proche de celle d'un film que de fibres.

En considérant ces facteurs, différentes limitations sur les tests pratiqués apparaissent. Les tests d'imagerie LIVE/DEAD sont basés sur les cellules visibles par microscopie. L'opacité des matériaux a été une difficulté à surmonter, si la face ensemencée d'un échantillon n'était pas face à l'objectif du microscope, les cellules étaient impossibles à repérer. Dans le cas du PLA, il est donc possible que des cellules ayant colonisé l'intérieur du matériau soient restées invisibles au microscope. En effet, les images des cellules ensemencées sur le PLA montraient une forte mort cellulaire au jour 7, pourtant les tests de prolifération montrent une prolifération largement présente à cette période et comparable à celle présente sur le PLA-nBG, qui est un signe de bonne santé des cellules. L'absence de ces cellules en bonne

santé sur les images obtenues pourrait s'expliquer par leur pénétration dans le matériau, étant donné qu'aucun test n'ayant utilisé de coupe transversale n'a eu lieu. Dans le cas du PLA-nBG, les cellules sont facilement visibles à la surface, car le matériau a des pores de taille très réduite, et les cellules ont proliféré en surface, car elles ne pouvaient pas infiltrer le matériau.

Cette infiltration pourrait aussi avoir impacté le test PicoGreen. Le test se base sur la digestion de cartilages et de tissus mous contenant des cellules pour en extraire l'ADN. Dans le cas du PLA-nBG, l'ADN des cellules proliférant en surface est facilement extrait. Dans le cas du PLA, même si les cellules présentes à l'intérieur de l'échafaudage étaient digérées, l'échantillon de matériau ne s'est pas dissous. Des molécules d'ADN pourraient être restées à l'intérieur du matériau au lieu d'être suspendues dans le milieu, et donc nos analyses de concentration d'ADN seraient faussées.

Certains de nos essais pourraient donc être faussés à cause de la structure tridimensionnelle de l'échafaudage en PLA pur, comparé à la structure plus proche du film à deux dimensions, bien que fibreuses, du PLA-nBG.

5.2.3 Taille et composition des nanoparticules

Les nBG utilisées dans cette étude ont été fournies par un fabricant externe, la taille certifiée pour ces nanoparticules était inférieure à 500 nm. Considérant la taille des fibres produites durant cette étude, 500 nm est une grande dimension. La taille des nanoparticules les empêche d'être pleinement assimilées dans les fibres et de les renforcer et elles deviennent donc des points de faiblesse dans la structure des fibres, diminuant la solidité du matériau. La grande taille des nanoparticules diminue aussi le ratio surface/volume et limite donc la dissolution des nBG et le relâchement de cations [66, 119]. L'effet des nBG est donc plus lent, ce qui explique que la majorité des résultats significativement différents sont visibles au jour 7 contrairement au jour 3 ou au jour 1 des cultures de cellules sur le matériau. Les verres à base de silicates ne sont pas non plus ceux dont la dissolution est la plus rapide, comparé aux verres à base de borate [65]. Des nBG plus petites, avec des compositions différentes, pourraient permettre d'améliorer les effets sur la prolifération et la migration des cellules ensemencées sur le matériau, et d'améliorer la rapidité avec laquelle ces effets se font ressentir. D'autre part, les effets antibactériens de l'échafaudage pourraient être améliorés par l'ajout de différents métaux (magnésium, zinc, cuivre, etc.) dans la composition des nBG.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

6.1 Synthèse des travaux

Dans cette étude, nous avons produit différents matériaux conçus comme des échafaudages cellulaires pour des plaies diabétiques. Ces matériaux ont été produits à l'aide de la technique d'électrofilage. Dans un premier temps, nous avons produit des fibres de PVA et d'alginate, mais après avoir rencontré des obstacles difficilement surmontables, ce matériau a été écarté Dans un second temps, nous avons conçu un matériau à base de PLA et de nBG. Nous avons ensuite caractérisé mécaniquement ce matériau à l'aide d'un test de traction et n'avons pas constaté d'amélioration majeure en en présence de nBG. Des cellules L929 ont été ensemencées sur le matériau et leur prolifération ainsi que leur viabilité ont fait l'objet d'expériences. Les cellules proliféraient significativement plus sur le PLA-nBG que sur le PLA après 7 jours, et leur viabilité était aussi supérieure sur le PLA-nBG. La production de facteurs proangiogéniques par les cellules a été mesurée après 3 et 7 jours de culture, des différences significatives ont été constatées pour la production d'endogline et de PLGF-2, ce qui montre l'effet proangiogénique du matériau. Cet effet reste modeste et n'impacte pas la production de VEGF, des améliorations sont donc nécessaires afin d'augmenter le potentiel thérapeutique du matériau.

6.2 Limitations de la solution proposée

Durant cette étude, plusieurs limitations dans la préparation du matériau, le processus expérimental ou les résultats mesurés ont été constatées.

Le solvant utilisé pour la production de la solution d'électrofilage, le TFE, est capable de catalyser l'hydrolyse du PLA. Les nBG semblent catalyser ce processus. Selon la littérature, utiliser un autre système de solvant pourrait empêcher cette hydrolyse [109]. Plus de nBG pourraient alors être incorporées aux fibres afin d'améliorer leur effet thérapeutique, et le processus d'électrofilage pourrait être simplifié. La taille des fibres serait aussi plus importante, ce qui pourrait augmenter la taille des pores dans le matériau.

Certains résultats présentés ne tiennent pas compte de l'infiltration cellulaire dans les échafaudages de PLA, montrant donc des incohérences entre différents tests, comme les tests de prolifération et de viabilité. Les matériaux produits sont opaques, des tests supplémentaires sont nécessaires afin de mesurer l'influence de cette infiltration sur les mesures effectuées lors des tests de prolifération et de viabilité.

La taille et la composition des nBG posent des limitations aux performances du matériau. La grande taille des nanoparticules limite leur incorporation aux fibres, les nBG sont donc des points de jonction entre différentes fibres. Les nBG limitent grandement la mobilité des fibres et forment des points de rupture du matériau à des contraintes plus faibles que dans le cas du PLA pur. La taille importante des nanoparticules limite aussi leur réactivité de surface en limitant leur ration surface/volume, ralentissant l'effet thérapeutique de la dissolution des nBG en cations dans le milieu. Enfin, les nBG sont basés sur du silicate, et ce type de BG connaît une dissolution plus lente que d'autres types de verre bioactifs. Le BG 45S5 utilisé ici a des effets thérapeutiques bien connus, mais un effet antibactérien limité. Le potentiel antibactérien du BG pourrait être amélioré à l'aide de l'incorporation d'ions métalliques dans sa structure.

6.3 Améliorations futures

Ce matériau est un premier pas vers un échafaudage mieux conçu à l'usage des plaies diabétiques, cependant, plusieurs éléments de ce matériau pourraient être améliorés. De plus, différentes expériences pourraient être menées afin de mieux caractériser le matériau et son utilité dans le cadre d'une plaie diabétique.

Un nouveau système de solvant permettrait d'incorporer plus de nBG aux fibres de PLA, en limitant l'hydrolyse subie par ce dernier dans la solution d'électrofilage en présence de nBG. Cette méthode permettrait aussi d'assurer une plus grande taille de pores dans les matelas de fibres et améliorerait l'infiltration cellulaire dans le matériau en limitant la diminution de diamètre des fibres.

L'utilisation de nBG à base de borate permettrait une dissolution plus rapide des nBG, et donc un effet thérapeutique plus rapide et prononcé. Des nBG plus petites, avec des diamètres de moins de 100 nm par exemple, iraient aussi dans ce sens en augmentant la réactivité de surface des nBG. Ces nBG plus fines pourraient plus facilement être incorporées aux fibres de PLA et renforceraient donc le matériau, lui permettant d'obtenir une rigidité plus attrayante pour les cellules de la peau.

Différentes expériences pourraient amener des résultats intéressants et plus d'informations quant à l'utilité du PLA-nBG dans le cadre de la guérison des plaies. La durée de vie du matériau dans un fluide corporel simulé, contenant notamment des estérases, permettrait de déterminer sa durée de vie dans une plaie diabétique et de savoir si elle est adéquate à l'application considérée. Des expériences d'imagerie LIVE/DEAD sur des échantillons de matériau plus épais permettraient de déterminer la pénétration des cellules dans le matériau.

Finalement, des essais du matériau optimisé sur des modèles animaux, par exemple des rats diabétiques, permettraient de déterminer plus précisément les effets bénéfiques apportés par le matériau. La rapidité de la fermeture des plaies pourrait être étudiée, et des tests de coloration histologiques concernant certains marqueurs (par exemple le CD31) pourraient être menés pour déterminer de façon quantitative les effets du matériau dans un environnement de plaie diabétique.

RÉFÉRENCES

[1] C. Diabetes, "Diabetes in Canada : Backgrounder," Diabetes Canada, Ottawa, Rapport technique, 2022. [En ligne]. Disponible : https://www.diabetes.ca/advocacy---policies/advocacy-reports/national-and-provincial-backgrounders/diabetes-in-canada

[2] C. Pelletier, S. Dai, K. C. Roberts, A. Bienek, J. Onysko et L. Pelletier, "Report summary. Diabetes in Canada : facts and figures from a public health perspective," *Chronic Diseases and Injuries in Canada*, vol. 33, n°. 1, p. 53–54, déc. 2012.

[3] N. Tucker, J. J. Stanger, M. P. Staiger, H. Razzaq et K. Hofman, "The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995," *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, vol. 7, n°. 2_suppl, p. 155892501200702S10, juin 2012, publisher : SAGE Publications Ltd STM. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1177/155892501200702S10

[4] Y. Zheng, "3 - Fabrication on bioinspired surfaces," dans *Bioinspired Design of Materials Surfaces*, ser. Materials Today, Y. Zheng, édit. Elsevier, janv. 2019, p. 99–146. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012814843300003X

[5] Y. Gilaberte, L. Prieto-Torres, I. Pastushenko et Juarranz, "Chapter 1 - Anatomy and Function of the Skin," dans *Nanoscience in Dermatology*, M. R. Hamblin, P. Avci et T. W. Prow, édit. Boston : Academic Press, janv. 2016, p. 1–14. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802926800001X

[6] G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon et M. T. Longaker, "Wound repair and regeneration," *Nature*, vol. 453, n°. 7193, p. 314–321, mai 2008, number : 7193 Publisher : Nature Publishing Group. [En ligne]. Disponible : https://www.nature.com/articles/nature07039

[7] S. Barrientos, O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem et M. Tomic-Canic, "Growth factors and cytokines in wound healing," *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, vol. 16, n°. 5, p. 585–601, oct. 2008.

[8] M. Rodrigues, N. Kosaric, C. A. Bonham et G. C. Gurtner, "Wound Healing : A Cellular Perspective," *Physiological Reviews*, vol. 99, n°. 1, p. 665–706, janv. 2019, publisher : American Physiological Society. [En ligne]. Disponible : https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00067.2017

[9] T. A. Wilgus, S. Roy et J. C. McDaniel, "Neutrophils and Wound Repair :

Positive Actions and Negative Reactions," *Advances in Wound Care*, vol. 2, nº. 7, p. 379–388, sept. 2013. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763227/

[10] L. A. DiPietro, "Angiogenesis and wound repair : when enough is enough," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 100, nº. 5, p. 979–984, nov. 2016. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R

[11] J. Hux, J. Booth, P. Slaughter et A. Laupacis, "Diabetes in Ontario : An ICES Practice Atlas," Institute for Clinical Evaluative Sciences, Rapport technique, juin 2003. [En ligne]. Disponible : https://www.ices.on.ca/Publications/Atlases-and-Reports/2003/Diabetes-in-Ontario.aspx

[12] D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil et J. Shaw, "IDF Diabetes Atlas : Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 94, nº. 3, p. 311–321, déc. 2011. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822711005912

[13] D. St-Cyr et L. Martineau, "L'ulcère du pied diabétique - Partie 1 - Épidémiologie et évaluation," *Perspective infirmiere : revue officielle de l'Ordre des infirmieres et infirmiers du Quebec*, vol. 14, nº. 1, févr. 2017, publisher : Perspect Infirm. [En ligne]. Disponible : https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29341545/

[14] P. Carmeliet et E. Storkebaum, "Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system : implications for neurological disorders," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 13, nº. 1, p. 39–53, févr. 2002. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952101902903

[15] O. Stojadinovic, I. Pastar, K. A. Gordon et M. Tomic-Canic, "Physiology and Pathophysiology of Wound Healing in Diabetes," dans *The Diabetic Foot : Medical and Surgical Management*, ser. Contemporary Diabetes, A. Veves, J. M. Giurini et F. W. LoGerfo, édit. Totowa, NJ : Humana Press, 2012, p. 127–149. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/978-1-61779-791-0_7

[16] N. Singh, D. G. Armstrong et B. A. Lipsky, "Preventing foot ulcers in patients with diabetes," *JAMA*, vol. 293, nº. 2, p. 217–228, janv. 2005.

[17] A. Hingorani, G. Lamuraglia, P. Henke, M. Meissner, L. Loretz, K. Zinszer, V. Driver, R. Frykberg, T. Carman, W. Marston, J. Mills, M. Murad et Brooklyn, "The management of diabetic foot : A clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 63, févr. 2016.

[18] R. G. Frykberg, T. Zgonis, D. G. Armstrong, V. R. Driver, J. M. Giurini, S. R. Kravitz, A. S. Landsman, L. A. Lavery, J. C. Moore, J. M. Schuberth,

D. K. Wukich, C. Andersen et J. V. Vanore, “Diabetic Foot Disorders : A Clinical Practice Guideline (2006 Revision),” *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, vol. 45, n°. 5, Supplement, p. S1–S66, sept. 2006. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1067251607600015

[19] M. Mieczkowski, B. Mrozikiewicz-Rakowska, M. Kowara, M. Kleibert et L. Czupryniak, “The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n°. 14, p. 7930, janv. 2022, number : 14 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : https://www.mdpi.com/1422-0067/23/14/7930

[20] M. Delamaire, D. Maugendre, M. Moreno, M.-C. Le Goff, H. Allannic et B. Genetet, “Impaired Leucocyte Functions in Diabetic Patients,” *Diabetic Medicine*, vol. 14, n°. 1, p. 29–34, 1997, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/%28SICI%291096-9136%28199701%2914%3A1%3C29%3A%3AAID-DIA300%3E3.0.CO%3B2-V. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-9136%28199701%2914%3A1%3C29%3A%3AAID-DIA300%3E3.0.CO%3B2-V

[21] L. Menegazzo, S. Ciciliot, N. Poncina, M. Mazzucato, M. Persano, B. Bonora, M. Albiero, S. Vigili de Kreutzenberg, A. Avogaro et G. P. Fadini, “NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes,” *Acta Diabetologica*, vol. 52, n°. 3, p. 497–503, juin 2015. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s00592-014-0676-x

[22] S. Khanna, S. Biswas, Y. Shang, E. Collard, A. Azad, C. Kauh, V. Bhasker, G. M. Gordillo, C. K. Sen et S. Roy, “Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice,” *PLOS ONE*, vol. 5, n°. 3, p. e9539, mars 2010, publisher : Public Library of Science. [En ligne]. Disponible : https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009539

[23] K. Maruyama, J. Asai, M. Ii, T. Thorne, D. W. Losordo et P. A. D’Amore, “Decreased Macrophage Number and Activation Lead to Reduced Lymphatic Vessel Formation and Contribute to Impaired Diabetic Wound Healing,” *The American Journal of Pathology*, vol. 170, n°. 4, p. 1178–1191, avr. 2007. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010613338

[24] B. A. Mast et G. S. Schultz, “Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds,” *Wound Repair and Regeneration*, vol. 4, n°. 4, p. 411–420, 1996, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1524-475X.1996.40404.x. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1524-475X.1996.40404.x

[25] R. G. Sibbald et K. Y. Woo, “The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes,” *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 24, n°. S1, p. S25–S30, 2008, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/dmrr.847. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dmrr.847

[26] M. A. M. Loots, E. N. Lamme, J. R. Mekkes, J. D. Bos et E. Middelkoop, “Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation,” *Archives of Dermatological Research*, vol. 291, n°. 2, p. 93–99, mars 1999. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s004030050389

[27] I. Pastar, O. Stojadinovic, A. Krzyzanowska, S. Barrientos, C. Stuelten, K. Zimmerman, M. Blumenberg, H. Brem et M. Tomic-Canic, “Attenuation of the Transforming Growth Factor -Signaling Pathway in Chronic Venous Ulcers,” *Molecular Medicine*, vol. 16, n°. 3, p. 92–101, mars 2010. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00149

[28] O. Stojadinovic, H. Brem, C. Vouthounis, B. Lee, J. Fallon, M. Stallcup, A. Merchant, R. D. Galiano et M. Tomic-Canic, “Molecular Pathogenesis of Chronic Wounds : The Role of -Catenin and c-myc in the Inhibition of Epithelialization and Wound Healing,” *The American Journal of Pathology*, vol. 167, n°. 1, p. 59–69, juill. 2005. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010629537

[29] K. Zhou, Y. Ma et M. S. Brogan, “Chronic and non-healing wounds : The story of vascular endothelial growth factor,” *Medical Hypotheses*, vol. 85, n°. 4, p. 399–404, oct. 2015. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987715002364

[30] K.-A. Kim, Y.-J. Shin, J.-H. Kim, H. Lee, S.-Y. Noh, S.-H. Jang et O.-N. Bae, “Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms,” *Archives of Pharmacal Research*, vol. 35, n°. 2, p. 223–234, févr. 2012. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s12272-012-0203-y

[31] D. G. Armstrong, A. J. M. Boulton et S. A. Bus, “Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 376, n°. 24, p. 2367–2375, juin 2017.

[32] A. Tentolouris et N. Tentolouris, “Methods of Ulcer Healing,” dans *Atlas of the Diabetic Foot*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019, p. 205–228, section : 13 _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119255314.ch13. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119255314.ch13

[33] R. S. Rees, M. C. Robson, J. M. Smiell, B. H. Perry et T. P. U. S. Group, “Becaplermin gel in the treatment of pressure ulcers : a phase II randomized,

double-blind, placebo-controlled study," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 7, n°. 3, p. 141–147, 1999, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1524-475X.1999.00141.x. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1524-475X.1999.00141.x

[34] D. J. Margolis, C. Bartus, O. Hoffstad, S. Malay et J. A. Berlin, "Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 13, n°. 6, p. 531–536, 2005, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1524-475X.2005.00074.x. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-475X.2005.00074.x

[35] S. Yamakawa et K. Hayashida, "Advances in surgical applications of growth factors for wound healing," *Burns & Trauma*, vol. 7, p. s41 038–019–0148–1, janv. 2019. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1186/s41038-019-0148-1

[36] D. M. D. Ehrenfest, M. D. Corso, A. Diss, J. Mouhyi et J.-B. Charrier, "Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane," *Journal of Periodontology*, vol. 81, n°. 4, p. 546–555, 2010, _eprint : https ://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1902/jop.2009.090531. [En ligne]. Disponible : https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1902/jop.2009.090531

[37] M. Edmonds et European and Australian Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study Group, "Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers," *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, vol. 8, n°. 1, p. 11–18, mars 2009.

[38] C. M. Zelen, D. P. Orgill, T. Serena, R. Galiano, M. J. Carter, L. A. DiDomenico, J. Keller, J. Kaufman et W. W. Li, "A prospective, randomised, controlled, multicentre clinical trial examining healing rates, safety and cost to closure of an acellular reticular allogenic human dermis versus standard of care in the treatment of chronic diabetic foot ulcers," *International Wound Journal*, vol. 14, n°. 2, p. 307–315, avr. 2017.

[39] W. A. Marston, J. Hanft, P. Norwood, R. Pollak et Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group, "The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers : results of a prospective randomized trial," *Diabetes Care*, vol. 26, n°. 6, p. 1701–1705, juin 2003.

[40] A. u. R. Khan, Y. Morsi, T. Zhu, A. Ahmad, X. Xie, F. Yu et X. Mo, "Electrospinning : An emerging technology to construct polymer-based nanofibrous scaffolds for diabetic wound healing," *Frontiers of Materials Science*, févr. 2021. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s11706-021-0540-1

[41] D. Chouhan, N. Dey, N. Bhardwaj et B. B. Mandal, “Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration : Current status and advances,” *Biomaterials*, vol. 216, p. 119267, sept. 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961219303667

[42] B.-Y. Yang, C.-H. Hu, W.-C. Huang, C.-Y. Ho, C.-H. Yao et C.-H. Huang, “Effects of Bilayer Nanofibrous Scaffolds Containing Curcumin/Lithospermi Radix Extract on Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats,” *Polymers*, vol. 11, nº. 11, p. 1745, nov. 2019, number : 11 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : https://www.mdpi.com/2073-4360/11/11/1745

[43] J. Li et S. Zhuang, “Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria : Current state and perspectives,” *European Polymer Journal*, vol. 138, p. 109984, sept. 2020. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305720316980

[44] Y. Agarwal, P. S. Rajinikanth, S. Ranjan, U. Tiwari, J. Balasubramnaiam, P. Pandey, D. K. Arya, S. Anand et P. Deepak, “Curcumin loaded polycaprolactone-/polyvinyl alcohol-silk fibroin based electrospun nanofibrous mat for rapid healing of diabetic wound : An in-vitro and in-vivo studies,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 176, p. 376–386, avr. 2021. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021003019

[45] P. Yudaev, Y. Mezhuev et E. Chistyakov, “Nanoparticle-Containing Wound Dressing : Antimicrobial and Healing Effects,” *Gels*, vol. 8, nº. 6, p. 329, juin 2022, number : 6 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : https://www.mdpi.com/2310-2861/8/6/329

[46] A. Burns et W. T. Self, “11 - Antioxidant Inorganic Nanoparticles and Their Potential Applications in Biomedicine,” dans *Smart Nanoparticles for Biomedicine*, ser. Micro and Nano Technologies, G. Ciofani, édit. Elsevier, janv. 2018, p. 159–169. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128141564000112

[47] R. Augustine, A. Hasan, N. K. Patan, Y. B. Dalvi, R. Varghese, A. Antony, R. N. Unni, N. Sandhyarani et A.-E. A. Moustafa, “Cerium Oxide Nanoparticle Incorporated Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Membranes for Diabetic Wound Healing Applications,” *ACS biomaterials science & engineering*, vol. 6, nº. 1, p. 58–70, janv. 2020.

[48] R. Augustine, H. N. Malik, D. K. Singhal, A. Mukherjee, D. Malakar, N. Kalarikkal et S. Thomas, “Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties,” *Journal of*

Polymer Research, vol. 21, nº. 3, p. 347, févr. 2014. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s10965-013-0347-6

[49] R. Ahmed, M. Tariq, I. Ali, R. Asghar, P. Noorunnisa Khanam, R. Augustine et A. Hasan, "Novel electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/zinc oxide nanofibrous mats with antibacterial and antioxidant properties for diabetic wound healing," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 120, p. 385–393, déc. 2018. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018319469

[50] H. Thangarajah, I. N. Vial, R. H. Grogan, D. Yao, Y. Shi, M. Januszyk, R. D. Galiano, E. I. Chang, M. G. Galvez, J. P. Glotzbach, V. W. Wong, M. Brownlee et G. C. Gurtner, "HIF-1alpha dysfunction in diabetes," *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 9, nº. 1, p. 75–79, janv. 2010.

[51] H. Chen, P. Jia, H. Kang, H. Zhang, Y. Liu, P. Yang, Y. Yan, G. Zuo, L. Guo, M. Jiang, J. Qi, Y. Liu, W. Cui, H. A. Santos et L. Deng, "Upregulating Hif-1 by Hydrogel Nanofibrous Scaffolds for Rapidly Recruiting Angiogenesis Relative Cells in Diabetic Wound," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 5, nº. 8, p. 907–918, 2016, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adhm.201501018. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.201501018

[52] W. Gao, L. Sun, X. Fu, Z. Lin, W. Xie, W. Zhang, F. Zhao et X. Chen, "Enhanced diabetic wound healing by electrospun core–sheath fibers loaded with dimethyloxalylglycine," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 6, nº. 2, p. 277–288, 2018, publisher : Royal Society of Chemistry. [En ligne]. Disponible : https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/tb/c7tb02342a

[53] Q. Zhang, J.-H. Oh, C. H. Park, J.-H. Baek, H.-M. Ryoo et K. M. Woo, "Effects of Dimethyloxalylglycine-Embedded Poly(-caprolactone) Fiber Meshes on Wound Healing in Diabetic Rats," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, nº. 9, p. 7950–7963, mars 2017, publisher : American Chemical Society. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1021/acsami.6b15815

[54] X. Ren, Y. Han, J. Wang, Y. Jiang, Z. Yi, H. Xu et Q. Ke, "An aligned porous electrospun fibrous membrane with controlled drug delivery - An efficient strategy to accelerate diabetic wound healing with improved angiogenesis," *Acta Biomaterialia*, vol. 70, p. 140–153, avr. 2018.

[55] K. Dashnyam, A. El-Fiqi, J. O. Buitrago, R. A. Perez, J. C. Knowles et H.-W. Kim, "A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials," *Journal of Tissue Engineering*, vol. 8, p. 2041731417707339, janv. 2017, publisher : SAGE Publications Ltd STM. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1177/2041731417707339

[56] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen et T. K. Greenlee, “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 5, n°. 6, p. 117–141, 1971, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.820050611. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.820050611

[57] T. Mehrabi, A. S. Mesgar et Z. Mohammadi, “Bioactive Glasses : A Promising Therapeutic Ion Release Strategy for Enhancing Wound Healing,” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 6, n°. 10, p. 5399–5430, oct. 2020, publisher : American Chemical Society. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00528

[58] L. L. Hench, “Bioceramics,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 81, n°. 7, p. 1705–1728, 1998, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x

[59] L. Drago, M. Toscano et M. Bottagisio, “Recent Evidence on Bioactive Glass Antimicrobial and Antibiofilm Activity : A Mini-Review,” *Materials*, vol. 11, n°. 2, p. 326, févr. 2018. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5849023/

[60] J.-a. N. Oliver, Y. Su, X. Lu, P.-H. Kuo, J. Du et D. Zhu, “Bioactive glass coatings on metallic implants for biomedical applications,” *Bioactive Materials*, vol. 4, p. 261–270, déc. 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X19300465

[61] G. Kaur, O. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott et G. Pickrell, “A review of bioactive glasses : Their structure, properties, fabrication and apatite formation,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 102, n°. 1, p. 254–274, 2014, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.a.34690. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.34690

[62] A. Ito, K. Ojima, H. Naito, N. Ichinose et T. Tateishi, “Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics,” *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 50, n°. 2, p. 178–183, 2000, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/%28SICI%291097-4636%28200005%2950%3A2%3C178%3A%3AAID-JBM12%3E3.0.CO%3B2-5. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-4636%28200005%2950%3A2%3C178%3A%3AAID-JBM12%3E3.0.CO%3B2-5

[63] B. E. Tepedelen, E. Soya et M. Korkmaz, “Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process,” *Biological Trace*

Element Research, vol. 174, nº. 2, p. 309–318, déc. 2016. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s12011-016-0729-9

[64] L. Bi, M. N. Rahaman, D. E. Day, Z. Brown, C. Samujh, X. Liu, A. Mohammadkhah, V. Dusevich, J. D. Eick et L. F. Bonewald, "Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model," *Acta Biomaterialia*, vol. 9, nº. 8, p. 8015–8026, août 2013. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706113002249

[65] A. M. Deliormanlı et M. N. Rahaman, "Direct-write assembly of silicate and borate bioactive glass scaffolds for bone repair," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 32, nº. 14, p. 3637–3646, nov. 2012. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955221912002683

[66] M. Mačković, A. Hoppe, R. Detsch, D. Mohn, W. J. Stark, E. Spiecker et A. R. Boccaccini, "Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles : in vitro reactivity on nanoscale and biocompatibility," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14, nº. 7, p. 966, juin 2012. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s11051-012-0966-6

[67] P. Sepulveda, J. R. Jones et L. L. Hench, "In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 61, nº. 2, p. 301–311, 2002, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.10207. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.10207

[68] Q. Chen, J. Wu, Y. Liu, Y. Li, C. Zhang, W. Qi, K. W. K. Yeung, T. M. Wong, X. Zhao et H. Pan, "Electrospun chitosan/PVA/bioglass Nanofibrous membrane with spatially designed structure for accelerating chronic wound healing," *Materials Science and Engineering : C*, vol. 105, p. 110083, déc. 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118335677

[69] W. Gao, W. Jin, Y. Li, L. Wan, C. Wang, C. Lin, X. Chen, B. Lei et C. Mao, "A highly bioactive bone extracellular matrix-biomimetic nanofibrous system with rapid angiogenesis promotes diabetic wound healing," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, nº. 35, p. 7285–7296, sept. 2017, publisher : The Royal Society of Chemistry. [En ligne]. Disponible : https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/tb/c7tb01484h

[70] D. G. Armstrong, D. P. Orgill, R. D. Galiano, P. M. Glat, L. A. DiDomenico, M. J. Carter et C. M. Zelen, "A multi-centre, single-blinded randomised controlled clinical trial evaluating the effect of resorbable glass fibre matrix in the treatment of diabetic foot ulcers," *International Wound Journal*, vol. 19, nº. 4, p. 791–801, 2022, _eprint :

https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/iwj.13675. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iwj.13675

[71] S. Chen, Z. Huan, L. Zhang et J. Chang, "The clinical application of a silicate-based wound dressing (DermFactor®) for wound healing after anal surgery : A randomized study," *International Journal of Surgery*, vol. 52, p. 229–232, avr. 2018. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919118305661

[72] C. Dwivedi, I. Pandey, H. Pandey, S. Patil, S. B. Mishra, A. C. Pandey, P. Zamboni, P. W. Ramteke et A. V. Singh, "In vivo diabetic wound healing with nanofibrous scaffolds modified with gentamicin and recombinant human epidermal growth factor," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 106, n°. 3, p. 641–651, 2018, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.a.36268. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.36268

[73] D. Chouhan, G. Janani, B. Chakraborty, S. K. Nandi et B. B. Mandal, "Functionalized PVA-silk blended nanofibrous mats promote diabetic wound healing via regulation of extracellular matrix and tissue remodelling," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 12, n°. 3, p. e1559–e1570, mars 2018.

[74] S. C. Notodihardjo, N. Morimoto, N. Kakudo, T. Mitsui, T. M. Le, Y. Tabata et K. Kusumoto, "Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing," *Regenerative Therapy*, vol. 10, p. 1–9, juin 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352320418300440

[75] S. A. Sell, P. S. Wolfe, J. J. Ericksen, D. G. Simpson et G. L. Bowlin, "Incorporating Platelet-Rich Plasma into Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications," *Tissue Engineering. Part A*, vol. 17, n°. 21-22, p. 2723–2737, nov. 2011. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3204198/

[76] P. Losi, T. Al Kayal, M. Buscemi, I. Foffa, A. Cavallo et G. Soldani, "Bilayered Fibrin-Based Electrospun-Sprayed Scaffold Loaded with Platelet Lysate Enhances Wound Healing in a Diabetic Mouse Model," *Nanomaterials*, vol. 10, n°. 11, p. 2128, nov. 2020, number : 11 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : https://www.mdpi.com/2079-4991/10/11/2128

[77] F. Xu, D. Zou, T. Dai, H. Xu, R. An, Y. Liu et B. Liu, "Effects of incorporation of granule-lyophilised platelet-rich fibrin into polyvinyl alcohol hydrogel on wound healing," *Scientific Reports*, vol. 8, n°. 1, p. 14042, sept. 2018, number : 1 Publisher : Nature Publishing Group. [En ligne]. Disponible : https://www.nature.com/articles/s41598-018-32208-5

[78] T. Zhang, Z. Xiang, L. Liu, Z. Ma, M. Panteleev, F. I. Ataullakhanov et Q. Shi, "Bioinspired Platelet-Anchored Electrospun Meshes for Tight Inflammation Manipulation and Chronic Diabetic Wound Healing," *Macromolecular Bioscience*, vol. n/a, n°. n/a, p. 2300036, juin 2023, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mabi.202300036. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mabi.202300036

[79] J. Choi, K. W. Minn et H. Chang, "The Efficacy and Safety of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells : An Update," *Archives of Plastic Surgery*, vol. 39, n°. 06, p. 585–592, nov. 2012, publisher : Thieme Medical Publishers, Inc. [En ligne]. Disponible : http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.5999/aps.2012.39.6.585

[80] S. Akbarzadeh, M. B. McKenzie, M. M. Rahman et H. Cleland, "Allogeneic Platelet-Rich Plasma : Is It Safe and Effective for Wound Repair ?" *European Surgical Research*, vol. 62, n°. 1, p. 1–9, 2021, publisher : Karger Publishers. [En ligne]. Disponible : https://www.karger.com/Article/FullText/514223

[81] S.-H. Jeong, S.-K. Han et W.-K. Kim, "Treatment of Diabetic Foot Ulcers Using a Blood Bank Platelet Concentrate," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 125, n°. 3, p. 944, mars 2010. [En ligne]. Disponible : https://journals.lww.com/plasreconsurg/Abstract/2010/03000/Treatment_of_Diabetic_Foot_Ulcers_Using_a_Blood.24.aspx

[82] X. Liao, J.-X. Liang, S.-H. Li, S. Huang, J.-X. Yan, L.-L. Xiao, J.-X. Song et H.-W. Liu, "Allogeneic Platelet-Rich Plasma Therapy as an Effective and Safe Adjuvant Method for Chronic Wounds," *Journal of Surgical Research*, vol. 246, p. 284–291, févr. 2020. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480419306535

[83] J. Stechmiller, L. Cowan et G. Schultz, "The Role of Doxycycline as a Matrix Metalloproteinase Inhibitor for the Treatment of Chronic Wounds," *Biological Research For Nursing*, vol. 11, n°. 4, p. 336–344, avr. 2010, publisher : SAGE Publications. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1177/1099800409346333

[84] S. Tort, F. Acartürk et A. Beşikci, "Evaluation of three-layered doxycycline-collagen loaded nanofiber wound dressing," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 529, n°. 1, p. 642–653, août 2017. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517317306269

[85] S. Tort, F. T. Demiröz, Coşkun Cevher, S. Sarıbaş, C. Özoğul et F. Acartürk, "The effect of a new wound dressing on wound healing : Biochemical and histopathological evaluation," *Burns*, vol. 46, n°. 1, p. 143–155, févr. 2020. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417918309768

[86] S. Sakai, M. Tsumura, M. Inoue, Y. Koga, K. Fukano et M. Taya, "Polyvinyl alcohol-based hydrogel dressing gellable on-wound via a co-enzymatic reaction triggered by glucose in the wound exudate," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, n°. 38, p. 5067–5075, sept. 2013, publisher : The Royal Society of Chemistry. [En ligne]. Disponible : https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/tb/c3tb20780c

[87] W.-R. Lee, J.-H. Park, K.-H. Kim, S.-J. Kim, D.-H. Park, M.-H. Chae, S.-H. Suh, S.-W. Jeong et K.-K. Park, "The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 17, n°. 4, p. 505–510, 2009, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1524-475X.2009.00496.x. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-475X.2009.00496.x

[88] M. A. Taemeh, A. Shiravandi, M. A. Korayem et H. Daemi, "Fabrication challenges and trends in biomedical applications of alginate electrospun nanofibers," *Carbohydrate Polymers*, vol. 228, p. 115419, janv. 2020. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719310860

[89] A. M. Reed et D. K. Gilding, "Biodegradable polymers for use in surgery — poly(ethylene oxide)/poly(ethylene terephthalate) (PEO/PET) copolymers : 2. In vitro degradation," *Polymer*, vol. 22, n°. 4, p. 499–504, avr. 1981. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032386181901695

[90] S. A. Stone, P. Gosavi, T. J. Athauda et R. R. Ozer, "In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers," *Materials Letters*, vol. 112, p. 32–35, déc. 2013. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X13011932

[91] A. Sharma, A. Gupta, G. Rath, A. Goyal, R. B. Mathur et S. R. Dhakate, "Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, n°. 27, p. 3410–3418, 2013, publisher : Royal Society of Chemistry. [En ligne]. Disponible : https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/tb/c3tb20487a

[92] Y. Tang, X. Lan, C. Liang, Z. Zhong, R. Xie, Y. Zhou, X. Miao, H. Wang et W. Wang, "Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing," *Carbohydrate Polymers*, vol. 219, p. 113–120, sept. 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719305016

[93] S. Najafi, A. Gholipour-Kanani, N. Eslahi et S. H. Bahrami, "Study on release of cardamom extract as an antibacterial agent from electrospun scaffold based on sodium alginate," *The Journal of The Textile Institute*, vol. 112, n°. 9, p. 1482–1490, sept. 2021,

publisher : Taylor & Francis _eprint : https ://doi.org/10.1080/00405000.2020.1825164. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1080/00405000.2020.1825164

[94] T. A. Jeckson, Y. P. Neo, S. P. Sisinthy, J. B. Foo, H. Choudhury et B. Gorain, "Formulation and characterisation of deferoxamine nanofiber as potential wound dressing for the treatment of diabetic foot ulcer," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 66, p. 102751, déc. 2021. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224721004317

[95] S. Safi, M. Morshed, S. A. H. Ravandi et M. Ghiaci, "Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium alginate/poly(ethylene oxide)," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 104, n°. 5, p. 3245–3255, 2007, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/app.25696. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.25696

[96] C. C. DeMerlis et D. R. Schoneker, "Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA)," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 41, n°. 3, p. 319–326, mars 2003. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691502002582

[97] Y. Idota, Y. Kogure, T. Kato, K. Yano, H. Arakawa, C. Miyajima, F. Kasahara et T. Ogihara, "Relationship between Physical Parameters of Various Metal Ions and Binding Affinity for Alginate," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 39, n°. 11, p. 1893–1896, 2016.

[98] M. A. Teixeira, J. C. Antunes, M. T. P. Amorim et H. P. Felgueiras, "Green Optimization of Glutaraldehyde Vapor-Based Crosslinking on Poly(Vinyl Alcohol)/Cellulose Acetate Electrospun Mats for Applications as Chronic Wound Dressings," *Proceedings*, vol. 69, n°. 1, p. 30, 2020, number : 1 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [En ligne]. Disponible : https://www.mdpi.com/2504-3900/69/1/30

[99] J. Long, A. Nand, C. Bunt et A. Seyfoddin, "Controlled release of dexamethasone from poly(vinyl alcohol) hydrogel," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 24, p. 1–29, avr. 2019.

[100] A. Pangon, S. Saesoo, N. Saengkrit, U. Ruktanonchai et V. Intasanta, "Multicarboxylic acids as environment-friendly solvents and in situ crosslinkers for chitosan/PVA nanofibers with tunable physicochemical properties and biocompatibility," *Carbohydrate Polymers*, vol. 138, p. 156–165, mars 2016. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715011297

[101] R. Salihu, S. I. Abd Razak, N. Ahmad Zawawi, M. Rafiq Abdul Kadir, N. Izzah Ismail, N. Jusoh, M. Riduan Mohamad et N. Hasraf Mat Nayan, "Citric acid : A green cross-linker of biomaterials for biomedical applications,"

European Polymer Journal, vol. 146, p. 110271, mars 2021. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305721000057

[102] J. J. Shi et E. L. Yang, "Green Electrospinning and Crosslinking of Polyvinyl Alcohol/Citric Acid," *Journal of Nano Research*, vol. 32, p. 32–42, 2015, conference Name : Journal of Nano Research Vol. 32 ISBN : 9783038358749 Publisher : Trans Tech Publications Ltd. [En ligne]. Disponible : https://www.scientific.net/JNanoR.32.32

[103] D. Nataraj, R. Reddy et N. Reddy, "Crosslinking electrospun poly (vinyl) alcohol fibers with citric acid to impart aqueous stability for medical applications," *European Polymer Journal*, vol. 124, p. 109484, févr. 2020. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305719313060

[104] R. A. Lusiana, D. Siswanta, M. Mudasir et T. Hayashita, "THE INFLUENCE OF PVA.cl.CITRIC ACID/CHITOSAN MEMBRANE HYDROPHICILITY ON THE TRANSPORT OF CREATININE AND UREA," *Indonesian Journal of Chemistry*, vol. 13, nº. 3, p. 262–270, déc. 2013. [En ligne]. Disponible : http://10.13.241.244/index.php/ijc/article/view/21286

[105] D. Harpaz, T. Axelrod, A. L. Yitian, E. Eltzov, R. S. Marks et A. I. Tok, "Dissolvable Polyvinyl-Alcohol Film, a Time-Barrier to Modulate Sample Flow in a 3D-Printed Holder for Capillary Flow Paper Diagnostics," *Materials*, vol. 12, nº. 3, p. 343, janv. 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6384612/

[106] L. Gautam, S. G. Warkar, S. I. Ahmad, R. Kant et M. Jain, "A review on carboxylic acid cross-linked polyvinyl alcohol : Properties and applications," *Polymer Engineering & Science*, vol. 62, nº. 2, p. 225–246, 2022, _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pen.25849. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pen.25849

[107] A. Çay, E. P. Akçakoca Kumbasar, Z. Keskin, Akduman et A. Şendemir Ürkmez, "Crosslinking of poly(vinyl alcohol) nanofibres with polycarboxylic acids : biocompatibility with human skin keratinocyte cells," *Journal of Materials Science*, vol. 52, nº. 20, p. 12 098–12 108, oct. 2017. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s10853-017-1370-5

[108] M. Mohseni Garakani, P. Ahangar, S. Watson, B. Nisol, M. R. Wertheimer, D. H. Rosenzweig et A. Ajji, "A novel 3D co-culture platform for integrating tissue interfaces for tumor growth, migration and therapeutic sensitivity : "PP-3D-S"," *Biomaterials Advances*, vol. 134, p. 112566, mars 2022. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493121007062

[109] H. Rokbani et A. Ajji, “Rheological Properties of Poly(lactic acid) Solutions Added with Metal Oxide Nanoparticles for Electrospinning,” *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 26, nº. 6, p. 2555–2565, juin 2018. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s10924-017-1155-6

[110] A. Saberi, M. Rafienia et E. Poorazizi, “A novel fabrication of PVA/Alginate-Bioglass electrospun for biomedical engineering application,” *Nanomedicine Journal*, vol. 4, nº. 3, p. 152–163, juill. 2017, publisher : Mashhad University of Medical Sciences. [En ligne]. Disponible : https://nmj.mums.ac.ir/article_8956.html

[111] D. A. Canales, F. Reyes, M. Saavedra, L. Peponi, A. Leonés, H. Palza, A. R. Boccaccini, A. Grünewald et P. A. Zapata, “Electrospun fibers of poly (lactic acid) containing bioactive glass and magnesium oxide nanoparticles for bone tissue regeneration,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 210, p. 324–336, juin 2022. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813022010078

[112] Z. Tabia, S. Akhtach, M. Bricha et K. El Mabrouk, “Tailoring the biodegradability and bioactivity of green-electrospun polycaprolactone fibers by incorporation of bioactive glass nanoparticles for guided bone regeneration,” *European Polymer Journal*, vol. 161, p. 110841, déc. 2021. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305721005759

[113] F. Iñiguez-Franco, R. Auras, G. Burgess, D. Holmes, X. Fang, M. Rubino et H. Soto-Valdez, “Concurrent solvent induced crystallization and hydrolytic degradation of PLA by water-ethanol solutions,” *Polymer*, vol. 99, p. 315–323, sept. 2016. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386116305845

[114] C. Gualandi, M. Govoni, L. Foroni, S. Valente, M. Bianchi, E. Giordano, G. Pasquinelli, F. Biscarini et M. L. Focarete, “Ethanol disinfection affects physical properties and cell response of electrospun poly(l-lactic acid) scaffolds,” *European Polymer Journal*, vol. 48, nº. 12, p. 2008–2018, déc. 2012. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305712003114

[115] C. Ollauri-Ibáñez, J. M. López-Novoa et M. Pericacho, “Endoglin-based biological therapy in the treatment of angiogenesis-dependent pathologies,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 17, nº. 9, p. 1053–1063, sept. 2017. [En ligne]. Disponible : https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14712598.2017.1346607

[116] L. Zhu, J. Qian, Y. Jiang, T. Yang, Q. Duan et X. Xiao, “PlGF Reduction Compromises Angiogenesis in Diabetic Foot Disease Through Macrophages,” *Frontiers in Immunology*, vol. 12, 2021. [En ligne]. Disponible : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.736153

[117] F. Cianfarani, G. Zambruno, L. Brogelli, F. Sera, P. M. Lacal, M. Pesce, M. C. Capogrossi, C. M. Failla, M. Napolitano et T. Odorisio, "Placenta Growth Factor in Diabetic Wound Healing : Altered Expression and Therapeutic Potential," *The American Journal of Pathology*, vol. 169, n°. 4, p. 1167–1182, oct. 2006. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010625904

[118] J. Wu et Y. Hong, "Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration," *Bioactive Materials*, vol. 1, n°. 1, p. 56–64, sept. 2016. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X16300135

[119] A. R. Boccaccini, M. Erol, W. J. Stark, D. Mohn, Z. Hong et J. F. Mano, "Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications : A review," *Composites Science and Technology*, vol. 70, n°. 13, p. 1764–1776, nov. 2010. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266353810002289

ANNEXE A RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Electrofilage du PVA hydrolysé à 99%



(a) 0.25ml/h (b) 0.5ml/h (c) 0.75ml/h

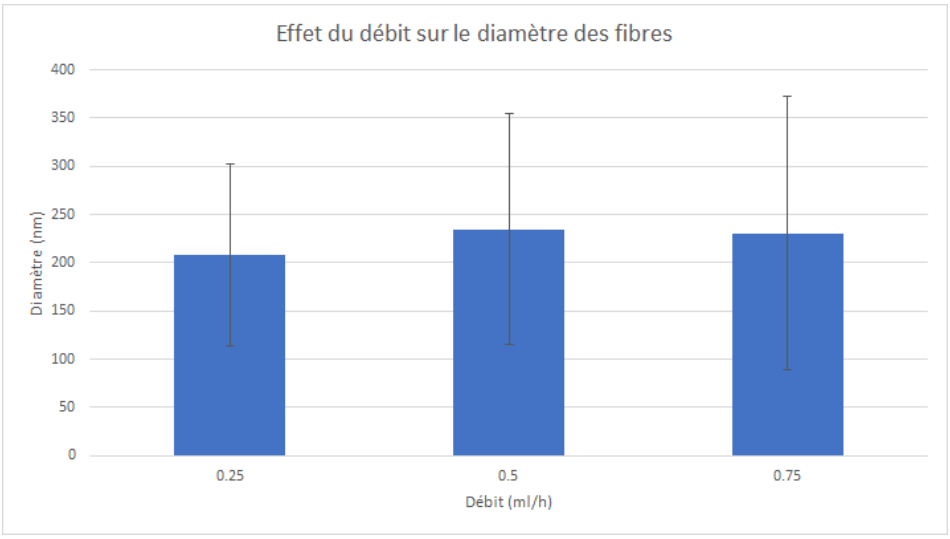
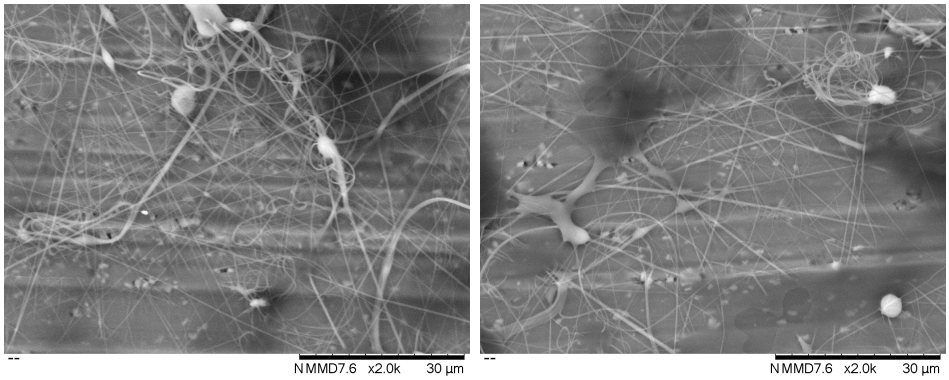


FIGURE A.1 Effet du débit d'électrofilage sur le diamètre des fibres de PVA électrolysé à 99% et d'alginate



(a) 4cm (b) 7cm

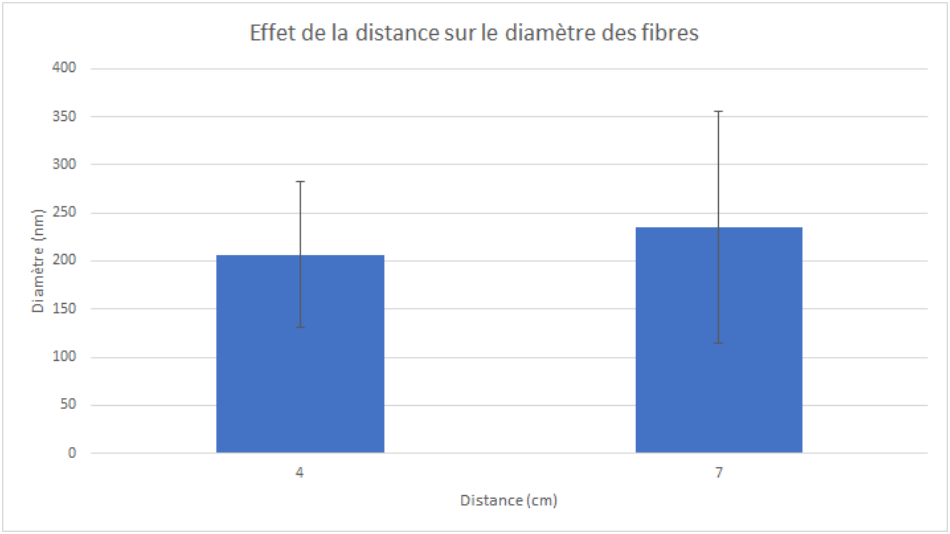


FIGURE A.2 Effet de la distance sur le diamètre des fibres de PVA hydrolysé à 99% et d'alginate

Réticulation à l'aide d'acide citrique

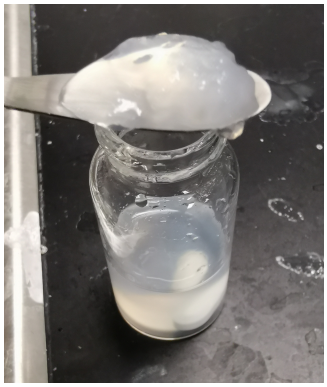


FIGURE A.3 Gel d'acide alginique formé lors de l'ajout de 5%(w/v) d'acide citrique à la solution d'électrofilage de PVA et d'alginate

Hydrolyse du PLA

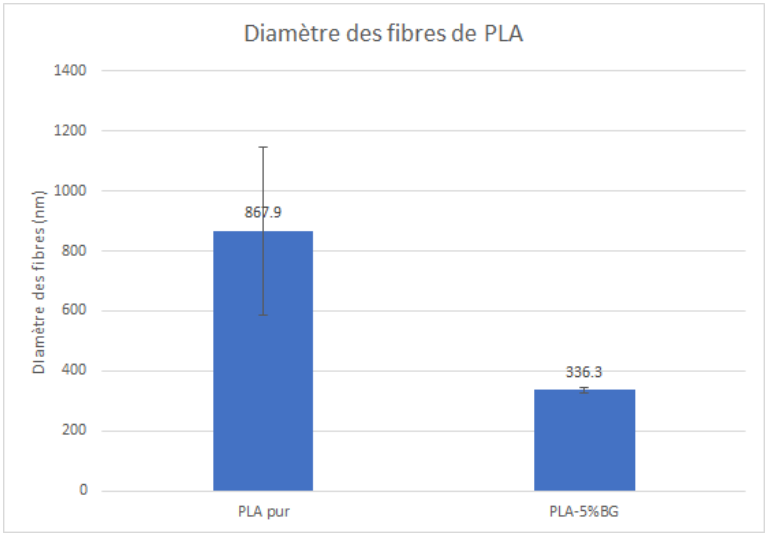
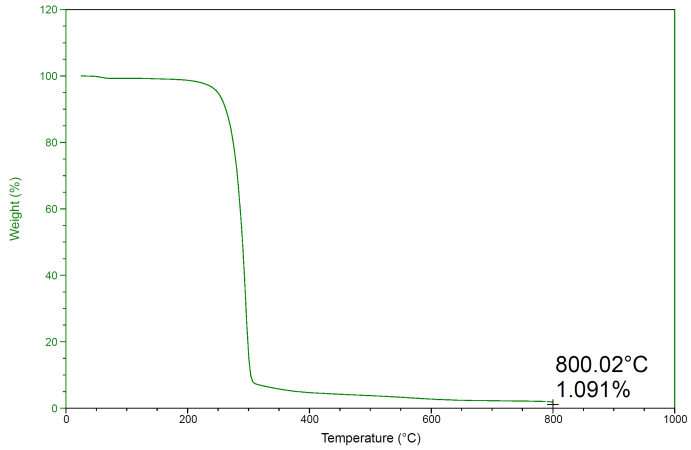
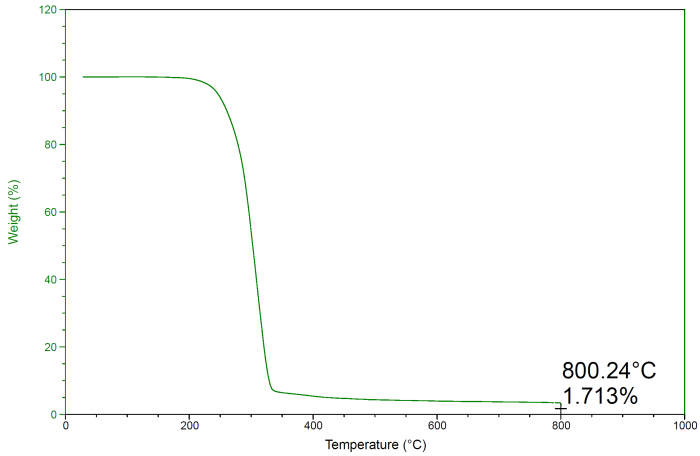


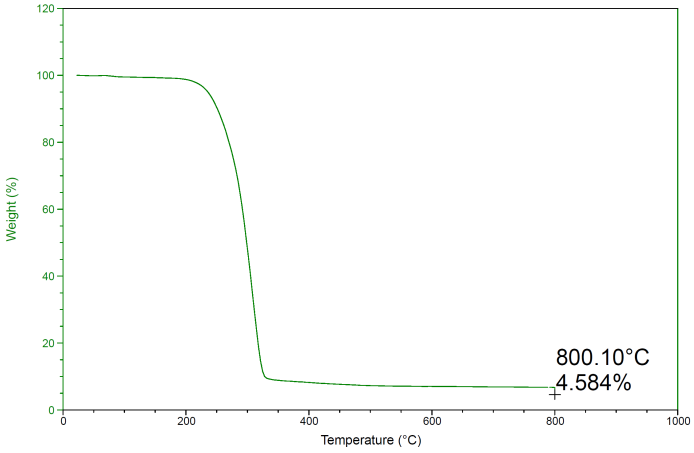
FIGURE A.4 taille des fibres de PLA comparé aux fibres de PLA-5%n-BG (temps de mélange court)



(a) Mélange rapide



(b) Mélange de solutions mère



(c) Mélange de solutions-mère et électrofilage court

FIGURE A.5 analyse TGA des fibres de PLA et de nBG après différentes méthode de préparation de la solution d'électrofilage