PolyPublie
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Optimisation in vitro et application in vivo d'implants injectables lyophilisés à base de chitosane et de thrombine pour la médecine régénératrice orthopédique
Auteur: Author:	Fiona Milano
Date:	2024
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Milano, F. (2024). Optimisation in vitro et application in vivo d'implants injectables lyophilisés à base de chitosane et de thrombine pour la médecine régénératrice orthopédique [Thèse de doctorat, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/62501/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/62501/
Directeurs de recherche: Advisors:	Marc Lavertu, & Gregory De Crescenzo
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

Optimisation *in vitro* et application *in vivo* d'implants injectables lyophilisés à base de chitosane et de thrombine pour la médecine régénératrice orthopédique

FIONA MILANO
Institut de génie biomédical

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*

Génie biomédical

Novembre 2024

© Fiona Milano, 2024.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Optimisation *in vitro* et application *in vivo* d'implants injectables lyophilisés à base de chitosane et de thrombine pour la médecine régénératrice orthopédique

présentée par **Fiona MILANO**
en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Géraldine MERLE, présidente
Marc LAVERTU, membre et directeur de recherche
Gregory DE CRESCENZO, membre et codirecteur de recherche
Eric QUENNEVILLE, membre
Adele CHANGOOR, membre externe

REMERCIEMENTS

Merci à :

— Marc Lavertu
— Gregory De Crescenzo
— Anik Chevrier
— Dong Wang
— Julie Tremblay
— Laura Ahunon
— Majed Ghattas
— Laure Siebierski
— Margaux Delvaux
— Nicholas Gilbert et l'équipe de Biomomentum
— Nathalie Louveaux
— Fabienne Louveaux
— Roberto Milano
— Maxime Dimidschstein

RÉSUMÉ

Les blessures musculo-squelettiques touchent chaque année 11 millions de Canadiens, engendrant des coûts de 37 milliards de dollars. Malgré les progrès en médecine, les traitements standards actuels présentent un taux d'échec postopératoire élevé, atteignant par exemple entre 20% et 60% pour la réparation de la coiffe des rotateurs (en fonction des études). Cette situation met en évidence un besoin médical crucial que les technologies actuelles ne parviennent pas à combler. Pour répondre à ce défi, le Laboratoire des Biomatériaux et du Cartilage (LBC) a mis au point une formulation de chitosane (CS) lyophilisée destinée à être solubilisée dans du plasma riche en plaquettes (PRP). Ce biomatériau injectable présente l'avantage de coaguler *in situ*, facilitant ainsi son application au site de la blessure. Cependant, l'implant ainsi obtenu se solidifie lentement, spécifiquement avec du PRP d'origine humaine. Cette lente coagulation peut être problématique, spécifiquement pour les chirurgies pendant lesquelles un fluide est utilisé pour irriguer la zone de travail (p. ex. chirurgies arthroscopiques). L'humidité présente au site de la blessure peut alors empêcher le biomatériau d'adhérer.

L'objectif général des trois études décrites dans cette thèse est de faire progresser le domaine de la médecine régénératrice par le développement et l'optimisation *in vitro* d'un biomatériau à base de chitosane, validé pour son homogénéité, et testé pour son efficacité *in vivo*, en particulier pour la régénération du tendon supra-épineux de la coiffe des rotateurs chez le lapin.

L'objectif spécifique de la première étude est de proposer un algorithme permettant de quantifier l'homogénéité d'images. L'homogénéité est un paramètre important pour les implants chitosane-PRP, car elle influence leur dégradation et la réponse tissulaire qui suit leur implantation. Une quantification précise de l'homogénéité permet donc de comparer différentes formulations du biomatériau entre-elles, mais aussi de valider que pour chaque lot de biomatériau produit, le chitosane se mélange de façon homogène aux composés sanguins.

L'objectif spécifique de la deuxième étude est de développer *in vitro* une nouvelle formulation du biomatériau chitosane-PRP possédant une coagulation accélérée. Le défi étant de trouver une formulation qui coagule suffisamment rapidement pour adhérer en milieu humide, mais pas trop rapidement, car cela la rendrait difficile (voire impossible) à injecter et manipuler. Pour accélérer la coagulation des implants, l'utilisation de thrombine est explorée.

L'objectif spécifique de la troisième étude est de confirmer que les implants composés de chitosane, de thrombine et de PRP ont le potentiel d'améliorer l'issue des chirurgies orthopé-

diques. Plus spécifiquement, le biomatériau a été utilisé pour une réparation d'une déchirure de la coiffe des rotateurs chez le lapin.

La recherche repose sur trois hypothèses principales : (1) une mesure fiable et quantifiable de l'homogénéité peut être établie et utilisée pour évaluer les biomatériaux chitosane-PRP ; (2) la coagulation du biomatériau peut être accélérée par l'ajout de thrombine à la solution de chitosane avant lyophilisation ; (3) une formulation lyophilisée de chitosane-thrombine, solubilisée dans du PRP peut améliorer significativement la régénération du tendon supra-épineux de la coiffe des rotateurs chez le lapin, améliorant ainsi les résultats des réparations chirurgicales.

La première étude introduit MASQH, un nouvel algorithme pour quantifier l'homogénéité d'images. Cet algorithme multi-échelles ne repose pas sur la segmentation et est basé sur une approche statistique. Cet algorithme est appliqué à des images synthétiques ou expérimentales (coupes histologiques de biomatériaux et microscopie de nanocomposites), démontrant ainsi sa fiabilité et sa robustesse.

La deuxième étude développe plusieurs formulations de chitosane-thrombine, lyophilisées puis solubilisées dans du PRP. Diverses concentrations de thrombine ont été évaluées pour leur impact sur le temps de coagulation, la facilité de manipulation et l'adhérence aux tissus tendineux en milieu humide, conformément aux exigences des chirurgiens orthopédistes. L'algorithme MASQH y est également utilisé pour évaluer l'homogénéité des implants avec et sans thrombine.

La troisième étude passe à un modèle animal, où la formulation la plus prometteuse de chitosane-thrombine-PRP est testée pour son efficacité à améliorer la régénération du tendon supra-épineux de la coiffe des rotateurs chez le lapin. La réparation des tissus y est évaluée par des tests mécaniques non destructifs, par microtomographie et par histologie. Les tendons réparés par la chirurgie standard (sutures) y sont comparés aux tendons réparés en présence de biomatériau (chirurgie standard + implant). L'algorithme MASQH a ici permis de valider que le lot de biomatériau produit était conforme aux attentes.

Au cours des travaux réalisés, la méthode MASQH a permis de quantifier l'homogénéité avec succès, permettant ainsi des comparaisons objectives entre les études et validant l'homogénéité des biomatériaux expérimentaux. La formulation optimisée de chitosane-thrombine avec 0.5 NIH/mL de thrombine (FIIa) a induit une augmentation significative de la vitesse de coagulation tout en conservant une facilité de manipulation, essentielle pour les applications cliniques. Finalement, les implants chitosane-thrombine-plasma-riche en plaquettes (CS-FIIa-PRP) ont amélioré la régénération des tendons *in vivo*, caractérisée par une récupération accélérée des propriétés mécaniques du tendon et une inhibition de l'ossification

hétérotopique.

Cet ensemble de travaux souligne l'utilité de la quantification de l'homogénéité dans la validation des biomatériaux chitosane-(thrombine)-PRP et introduit un implant prometteur de chitosane-thrombine-PRP pour la réparation tissulaire orthopédique. Les résultats suggèrent que l'intégration de tels biomatériaux avec les techniques chirurgicales standards pourrait conduire à de meilleurs résultats cliniques dans le traitement des déchirures de la coiffe des rotateurs, réduisant ainsi les taux élevés d'échec associés aux interventions chirurgicales actuelles.

ABSTRACT

Musculoskeletal injuries affect 11 million Canadians each year, resulting in costs of 37 billion dollars. Despite advances in medicine, current standard treatments have a high postoperative failure rate, ranging from 20 to 60% for rotator cuff repairs, for example. This situation highlights unmet medical needs that current technologies fail to meet. To address this challenge, the Laboratory of Biomaterials and Cartilage (LBC) developed a freeze-dried chitosan formulation designed to be solubilized in platelet-rich plasma (PRP). This injectable biomaterial has the advantage of coagulating *in situ*, thus facilitating its application at site of injury. However, the resulting implant solidifies slowly, particularly with human-derived PRP. This slow coagulation can be problematic, especially for surgeries where a fluid is used to irrigate the work area (e.g., arthroscopic surgeries). The fluid present at the injury site can then prevent the biomaterial from adhering.

The overall objective of the three studies described in this thesis is to advance the field of regenerative medicine by the *in vitro* development and optimization of a chitosan-based biomaterial, validate it for its homogeneity, and then test it *in vivo* for its efficacy, particularly for the regeneration of the supraspinatus tendon of the rotator cuff in rabbits.

The specific objective of the first study is to propose an algorithm to quantify homogeneity in images. Homogeneity is an important parameter for chitosan-PRP implants, as it influences their degradation and the tissue response that follows their implantation. A precise quantification of homogeneity thus allows comparing different formulations of the biomaterial among themselves, as well as validating that for each batch of biomaterial produced, the chitosan mixes homogeneously with the blood components.

The specific objective of the second study is to develop *in vitro* a new formulation of the chitosan-PRP biomaterial with accelerated coagulation. The challenge is to find a formulation that coagulates quickly enough to adhere in a wet environment, but not too quickly, as this would make it difficult (if not impossible) to inject and handle. To accelerate the coagulation of the implants, the use of thrombin is explored.

The specific objective of the third study is to confirm that implants composed of chitosan, thrombin, and PRP have the potential to improve the outcome of orthopedic surgeries. More specifically, the biomaterial was used for the repair of a rotator cuff tear in rabbits.

The research is based on three main hypotheses: (1) a reliable and quantifiable measure of homogeneity can be established and used to evaluate chitosan-PRP biomaterials; (2) the

coagulation of the biomaterial can be accelerated by adding thrombin to the chitosan solution before freeze-drying; (3) a freeze-dried formulation of chitosan-thrombin, solubilized in PRP, can significantly improve the regeneration of the supraspinatus tendon of the rotator cuff in rabbits, thereby improving the outcomes of surgical repairs.

The first study introduces MASQH, a new algorithm for quantifying homogeneity in images, which is multi-scale, segmentation-free, and based on a statistical approach. This algorithm is applied to synthetic or experimental images (histological sections of biomaterials and nanocomposite microscopy), demonstrating its reliability and robustness.

The second study analyzes several formulations of chitosan-thrombin, freeze-dried, and then solubilized in PRP. Various concentrations of thrombin were evaluated for their impact on coagulation time, ease of handling, and adhesion to tendon tissues in a wet environment, in accordance with the requirements of orthopedic surgeons. The MASQH algorithm is also used here to evaluate the homogeneity of implants with and without thrombin.

The third study moves to an animal model, where the most promising formulation of chitosan-thrombin-PRP is tested for its effectiveness in improving rotator cuff supra-spinatus tendon regeneration in rabbits. Tissue repair is evaluated through non-destructive mechanical testing, microtomography, and histology. Tendons repaired by standard surgery (sutures) are compared to tendons repaired in the presence of the biomaterial (standard surgery + implant). The MASQH algorithm was used here to validate that the produced batch of biomaterial met expectations.

Throughout the work carried out, the MASQH method successfully quantified homogeneity, enabling objective comparisons between studies and validating the homogeneity of experimental biomaterials. The optimized formulation of chitosan-thrombin with 0.5 NIH/mL of thrombin led to a significant increase in coagulation speed while maintaining ease of handling, essential for clinical applications. Finally, chitosan-thrombin-platelet-rich-plasma (CS-FIIa-PRP) implants improved *in vivo* tendon regeneration, characterized by an accelerated recovery of tendon mechanical properties and the inhibition of heterotopic ossification.

This body of work highlights the usefulness of homogeneity quantification in the validation of chitosan-(thrombin)-PRP biomaterials and introduces a promising chitosan-thrombin-PRP implant for orthopedic tissue repair. The results suggest that integrating such biomaterials with standard surgical techniques could lead to better clinical outcomes in the treatment of rotator cuff tears, thereby reducing the high failure rates associated with current surgical interventions.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iii

RÉSUMÉ iv

ABSTRACT vii

TABLE DES MATIÈRES ix

LISTE DES TABLEAUX xiv

LISTE DES FIGURES xv

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xviii

LISTE DES ANNEXES xix

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1
1.1 Contexte 1
1.2 Objectif général 3

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE 4
2.1 Fil conducteur 4
2.2 Blessures musculo-squelettiques et coiffe des rotateurs 4
2.2.1 Blessures musculo-squelettiques : définition et enjeux 4
2.2.2 Anatomie de la coiffe des rotateurs chez l'homme 6
2.2.3 Structure du tendon sain et de l'enthèse 8
2.2.4 Mécanisme de réparation des tendons 12
2.2.5 Chirurgie de la coiffe des rotateurs 15
2.3 Technologies d'augmentation en développement pour la réparation de la coiffe des rotateurs 17
2.4 Biomatériau hybride CS-PRP 20
2.4.1 Généralités sur le chitosane 20
2.4.2 Propriétés du chitosane en génie tissulaire 21
2.4.3 Propriétés de l'implant hybride CS-PRP 22
2.5 Autres biomatériaux à base de chitosane et de dérivés sanguins 27
2.6 Solidification de l'implant et cascade de coagulation 30

2.6.1 Cascade de coagulation 30
2.6.2 Solidification d'implants CS-Sang 32
2.6.3 Thrombine et autres facteurs de coagulation envisagés 33
2.7 Importance et quantification de l'homogénéité des implants CS-PRP 36
2.7.1 Importance de l'homogénéité des implants hybrides 36
2.7.2 Méthodes existantes pour la quantification de l'homogénéité 38
2.8 Modèle animal 43
2.8.1 Choix du modèle animal 43
2.8.2 Choix du modèle de lésion 48
2.9 Propriétés mécaniques et techniques de tests du tendon supra-épineux 48
2.9.1 Propriétés mécaniques des tendons : généralités 48
2.9.2 Tests dynamiques et tests à la rupture 51
2.9.3 Propriétés mécaniques du tendon supra-épineux 54
2.10 Le tissus osseux 57
2.10.1 Matrice extracellulaire osseuse 57
2.10.2 Morphologie macroscopique des os longs 60
2.10.3 Les cellules osseuses et le remodelage osseux 61
2.10.4 Réparation osseuse 62
2.10.5 Ossification hétérotopique 63
2.11 Histologie des tendons 65
2.11.1 Fixation et inclusion 65
2.11.2 Coloration 67
2.11.3 Analyse générale 68
2.11.4 Structure 69
2.11.5 Cellules 71

CHAPITRE 3 ARTICLE 1 : ROBUST SEGMENTATION-FREE ALGORITHM FOR HOMOGENEITY QUANTIFICATION IN IMAGES 73
3.1 Abstract 74
3.2 Introduction 74
3.3 Definition and motivation 76
3.3.1 Homogeneity definition 76
3.3.2 Motivation for a segmentation-free algorithm 76
3.4 Method 77
3.4.1 Proposed algorithm 77
3.5 Choice and influence of the algorithm parameters 81

3.6 Results and discussion 86
3.6.1 Assessment of the behavior and relevance of MASQH from synthetic images 86
3.6.2 Results for experimental CS-PRP images follows the expert classification and lead to small confidence intervals 91
3.6.3 Results for experimental nanaocomposites images show the pertinence of MASQH when compared with two other algorithms 95
3.6.4 The MASQH algorithm can be generalized for larger structure analysis 97
3.6.5 Additional considerations 98
3.7 Conclusion 98

CHAPITRE 4 ARTICLE 2 : INJECTABLE LYOPHILIZED CHITOSAN-THROMBIN-PLATELET-RICH PLASMA (CS-FIIA-PRP) IMPLANT TO PROMOTE TISSUE REGENERATION : *IN VITRO* AND *EX VIVO* SOLIDIFICATION PROPERTIES. 100
4.1 Abstract 101
4.2 Introduction 101
4.3 Materials and Methods 103
4.3.1 Preparation of freeze-dried chitosan formulations 103
4.3.2 Isolation of platelet-rich-plasma 104
4.3.3 Rehydration of the CS FD formulation 104
4.3.4 Assessment of clotting properties of CS-PRP formulations by thromboelastography 104
4.3.5 Assessment of clotting properties of CS-PRP formulations through rheology measurements 105
4.3.6 Assessment of the force required to eject the biomaterial 105
4.3.7 Assessment of hybrid clot mechanical properties through indentation 105
4.3.8 Assessment of hybrid clot homogeneity through histology and MASQH algorithm 106
4.3.9 Assessment of CS-PRP formulations adhesion to tendon tissues using an *ex vivo* test 106
4.3.10 Assessment of thrombin activity in freeze-dried chitosan formulations 107
4.3.11 Statistical analysis 107
4.4 Results and discussion 107

4.4.1 Chitosan freeze-dried with thrombin easily solubilises in PRP, exhibits thrombin activity, and maintains stability for at least 2 months at room temperature. . . . 107
4.4.2 Biomaterial containing 0.5 NIH/mL of thrombin is easily dispensed through an 18-gauge needle and 10cc-syringe up to 6 minutes after rehydration of the lyophilized formulation in PRP . . . 110
4.4.3 Rheometry reveals that thrombin concentration has a significant impact on storage and loss modulus, as well as on the time to gelation point . . . 112
4.4.4 Indentation experiments indicate that there is no significant difference in stiffness and equilibrium force between the coagulated biomaterials containing thrombin and the control samples. . . . 115
4.4.5 The adherence of the biomaterial to tendon tissues is impacted by the biomaterial-tendon contact duration and increases faster when thrombin is present . . . 116
4.4.6 Limitations . . . 118
4.5 Conclusions . . . 118

CHAPITRE 5 ARTICLE 3 : FREEZE-DRIED CHITOSAN-THROMBIN-PLATELET-RICH PLASMA IMPLANTS IMPROVE SUPRASPINATUS TENDON REGENERATION IN A RABBIT ROTATOR CUFF REPAIR MODEL. 119
5.1 Abstract . . . 120
5.2 Introduction . . . 120
5.3 Materials and Methods . . . 122
5.3.1 Experimental design . . . 122
5.3.2 Rotator cuff tear model and surgical repair . . . 124
5.3.3 Preparation of freeze-dried CS-FIIa formulations . . . 126
5.3.4 Preparation of PRP . . . 127
5.3.5 Solubilization of freeze-dried CS-FIIa formulations in PRP and implants injection . . . 127
5.3.6 Specimen collection . . . 127
5.3.7 Mechanical testing . . . 127
5.3.8 Micro-CT analysis . . . 129
5.3.9 Histological processing . . . 130
5.3.10 Statistical analysis . . . 131
5.4 Results and discussion . . . 131

5.4.1 CS-FIIa-PRP implants adhered to SSP tendon tissue and were resident within the bony trough and lateral tunnels up to 28 days post-surgery 131
5.4.2 CS-FIIa-PRP accelerated the improvement of both structural and material mechanical properties 4 weeks after surgery 131
5.4.3 CS-FIIa-PRP implants inhibited heterotopic ossification of SSP tendon tissue three months after surgery 136
5.4.4 CS-FIIa-PRP implants did not improve bone remodeling in the bony trough 137
5.4.5 CS-FIIa-PRP implants induced inflammation, improved macroscopic tendon attachment and influenced attachment location 140
5.4.6 CS-FIIa-PRP treatment was safe 143
5.4.7 Limitations 144
5.5 Conclusion and future studies 144

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE 146

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS 150
7.1 Synthèse des travaux 150
7.2 Limitations de la solution proposée 151
7.2.1 Algorithme MASQH 151
7.2.2 Développement et optimisation *in vitro* de biomatériaux CS-FIIa-PRP 152
7.2.3 Efficacité *in vivo* de biomatériaux CS-FIIa-PRP 152
7.3 Améliorations futures 153

RÉFÉRENCES 154

ANNEXES 176

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Prévalence, nombre annuel de chirurgies et taux d'échec pour 3 blessures musculo-squelettiques fréquentes 5
Tableau 2.2 Stratégies d'augmentation pour la réparation de la coiffe des rotateurs et leurs résultats 20
Tableau 2.3 Résumé des principales études réalisées sur les implants CS-PRP. . . 27
Tableau 2.4 Résumé des études sur la combinaison de chitosane et de dérivés sanguins pour différentes applications. 29
Tableau 2.5 Avantages et désavantages de différents modèles animaux pour la réparation de la coiffe des rotateurs. 47
Table 3.1 Description and value of the parameters 85
Table 3.2 Homogeneity indexes and expert classification 94
Table 3.3 Microhardness of each image in Figure 3.9. and corresponding homogeneity indexes obtained through MASQH and through region homogeneity and particle-free length algorithm. 97
Table 4.1 Percentage of maximal G' or G" value reached after a given time, for a given thrombin concentration 113
Table 5.1 Experimental design 124
Table 5.2 Tendon mechanical properties (data shown as mean±95% confidence interval). 133
Tableau 6.1 Comparaison des résultats de l'étude de Deprés-Tremblay *et al.* [16] et de notre étude. 149

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Les trois os de l'épaule. 7
Figure 2.2 Anatomie de la coiffe des rotateurs. 7
Figure 2.3 Schéma de la structure hiérarchisée des tendons. 9
Figure 2.4 La courbe contrainte-déformation du tendon et ses trois zones. 10
Figure 2.5 Histologie de l'enthèse. 11
Figure 2.6 Histologie de l'enthèse avant et après chirurgie de la coiffe des rotateurs. 12
Figure 2.7 Les trois phases de la réparation des tendons. 14
Figure 2.8 Chirurgie arthroscopique. 16
Figure 2.9 Vue arthroscopique de l'espace sous-acromial. 16
Figure 2.10 Structure de la chitine et exemple de structure du chitosane. 21
Figure 2.11 Le chitosane lyophilisé forme une éponge poreuse destinée à être réhydratée dans du plasma riche en plaquettes, formant un implant injectable. Image réalisée avec le logiciel BioRender. 22
Figure 2.12 La dispersion du chitosane parmi les composés sanguins varie en fonction de sa masse molaire. 24
Figure 2.13 A) Le plasma riche en plaquettes (PRP) seul coagule en se contractant. B) Combiné au CS, le PRP coagule pour former un caillot sans perte de volume. 24
Figure 2.14 La concentration en thrombine influence la structure du caillot et le diamètre des fibres de fibrinogène. 35
Figure 2.15 Échantillons histologiques des caillots chitosane-PRP. Image prise à 10X. 37
Figure 2.16 Même coupe qu'à la figure 2.15. Image prise à 80X. 37
Figure 2.17 Modèles de points simulés avec une intensité homogène. Gauche : 30 points par unité de surface. Milieu : 300 points par unité de surface. Droite : 3000 points par unité de surface. 39
Figure 2.18 Contrainte (σ) et déformation (ε) de matériau élastique, visqueux et viscoélastique. 49
Figure 2.19 Courbe force-élongation et courbe contrainte-déformation. 50
Figure 2.20 Courbes contrainte-déformation résultant d'un chargement cyclique a) pour un matériau parfaitement élastique et b) pour un matériau parfaitement visqueux. 50
Figure 2.21 Chargement et déchargement d'un matériau élastique pur. La zone entre les deux courbes représente l'hystérèse. 51

Figure 2.22 Déformation suite à une contrainte sinusoïdale d'un matériau visoélastique. 52
Figure 2.23 Le module de Young du tendon supra-épineux varie selon l'orientation du chargement et selon la zone du tendon. 55
Figure 2.24 Principe de la "Digital image correlation" 56
Figure 2.25 Résultat de la DIC sur un échantillon de composite de cellulose. . . . 57
Figure 2.26 Os réticulaire et os lamellaire 59
Figure 2.27 Schéma de l'os lamellaire. Les fibres de lamelles adjacentes présentent des orientations presque perpendiculaires. 59
Figure 2.28 Schéma d'un os long (ici tibia) et de ses trois parties : la diaphyse, les épiphyses et les métaphyses. On y retrouve deux structures macroscopiques de l'os : l'os cortical, compact, et l'os trabéculaire ("cancellous bone"), spongieux 61
Figure 2.29 Les 4 étapes de la réparation des fractures osseuses. 63
Figure 2.30 Exemple d'ossification hétérotopique suite à une chirurgie "mini-open" de la coiffe des rotateurs. 65
Figure 2.31 Guide pour la sélection de la méthode d'inclusion la plus adaptée selon le type d'échantillon tendineux à analyser. 67
Figure 2.32 Techniques d'histologie fréquemment utilisées pour l'étude des tendons. 68
Figure 2.33 Utilisation de la microscopie polarisée pour l'étude de la zone de transition tendon-muscle. 69
Figure 2.34 Utilisation de la microscopie polarisée pour l'étude de l'enthèse. . . . 71
Figure 3.1 Illustration of the principles underlying the proposed MASQH method 78
Figure 3.2 Flowchart depicting the MASQH method for the quantification of homogeneity. 80
Figure 3.3 Varying dispersion of particles in synthetic images. 88
Figure 3.4 Varying densities of particles in synthetic images. 90
Figure 3.5 Experimental images from the hybrid clot and generalization of the algorithm to whole slide. 91
Figure 3.6 Histological test images of chitosan (CS) dispersed in a CS-PRP hybrid clot. 93
Figure 3.7 For each image of Figure 3.6 : proportion of p-value > 0.05 for 100 analysis scales. 94
Figure 3.8 Comparison with the expert classification 95
Figure 3.9 Test electron micrographs of three nanocomposites samples. 95

Figure 3.10 Homogeneity indexes for the three images of Figure 3.9 versus hardness of the composites. Comparison with two other algorithms. 96
Figure 4.1 Biomaterial, thromboelastograph results and stability up to two months after freeze-drying. 110
Figure 4.2 Syringe ejectability of the biomaterial for four thrombin concentrations. 111
Figure 4.3 Rheological results for four thrombin concentrations : storage and loss modulus, time to gelation point and phase angle. 114
Figure 4.4 Average stiffness and force at equilibrium in response to an indentation compressive strain for biomaterials with four different thrombin concentrations as well as PRP. 116
Figure 4.5 Quantification of the adherence of the biomaterial to tendon tissues when soaked in 0.9% NaCl. 117
Figure 5.1 Surgical procedure for rotator cuff tear and transosseous repair 125
Figure 5.2 Surgical procedure for rotator cuff tear and transosseous repair 129
Figure 5.3 Supraspinatus tendon cross-sectional area and dynamic modulus for each study group 132
Figure 5.4 Supraspinatus tendon deformation per zone. 135
Figure 5.5 Presence of heterotopic ossification (HO) detected in some tendons after surgery 137
Figure 5.6 Micro-CT analysis of bone repair in the transosseous canal 2 weeks, 4 weeks and 3 months after surgery. 139
Figure 5.7 Safranin O/Fast Green stained paraffin sections of tendon 141
Figure 5.8 Safranin O/Fast Green stained paraffin sections of enthesis 143
Figure A.1 Acteurs de la cascade de coagulation et leurs interactions. 176
Figure C.1 Mean indexes and index distribution in function of the number of iterations used in the algorithm 180
Figure C.2 Mean indexes and index distribution in function of n, the number of squares used in the algorithm 181
Figure C.3 Mean indexes and index distribution in function of x, the number of the sample size 182

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

CS	Chitosane
DDa	Degré de Déacétylation
FD	Lyophilisé
FII	Thrombine
FIIa	Prothrombine
GAG	Glycosaminoglycanes
GLCM	Matrice de co-occurrence des niveaux de gris
HO	Ossification hétérotopique
HPA	Hydroxyapatite
ISP	Tendon infra-épineux
kDa	Kilodalton
LBC	Laboratoire des Biomatériaux et du Cartilage
Mn	Poids moléculaire
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
RBC	Globules rouges
RC	Coiffe des rotateurs
RCT	Déchirure de la coiffe des rotateurs
Rho	Rhodamine
SST	Tendon supra-épineux
TEG	Thromboelastographe
TF	Facteur tissulaire
VOI	Volume d'intérêt
WB	Sang complet
μCT	Microtomographie assistée par ordinateur

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Schéma de la cascade de coagulation	176
Annexe B	Article 1, Supplementary information 1 : “Details on the CS-PRP hybrid clot preparation”	177
Annexe C	Article 1, Supplementary information 2 : “MASQH’s robustness : an analysis”	178
Annexe D	Article 1, Supplementary information 3 : “Comparison of the 13 existing algorithms for global homogeneity quantification”	183
Annexe E	Article 2, Supplementary information 1 : “Choice of rheological parameters”	194
Annexe F	Article 2, Supplementary information 2 : “Video of biomaterial’s coagulation”	195
Annexe G	Article 3, Supplementary information 1 : “Mechanical tests on supraspinatus tendons.”	196
Annexe H	Article 3, Supplementary information 2 : “Histological scores of tendons and insertion sites”	198

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

Les blessures musculo-squelettiques touchent 11 millions de Canadiens chaque année pour un coût de 37 milliards de dollars. Or, les traitements standards actuels présentent un taux d'échec postopératoire important (situé, par exemple, entre 20 et 60% pour la coiffe des rotateurs [1]). Cela reflète des besoins médicaux que les technologies actuelles ne satisfont pas.

Pour pallier ce problème, le Laboratoire des Biomatériaux et du Cartilage (LBC) a développé une formulation de chitosane (CS) lyophilisé (FD) destinée à être solubilisée dans du plasma-riche-en plaquettes (PRP). L'implant ainsi obtenu présente les avantages d'être facilement injectable et de coaguler *in situ* [2]. Ce biomatériau, destiné à être utilisé en tant qu'adjuvant chirurgical, présente un potentiel réparateur pour des applications diverses du domaine de la médecine régénératrice orthopédique.

Le CS est un polymère linéaire cationique formé de deux types de monomères aléatoirement répartis : les monomères de N-acétyl glucosamine (unités acétylées) et ceux de glucosamine (unités déacétylées). Le CS est généralement obtenu par déacétylation alcaline de la chitine, un long polymère linéaire de N-acétyl glucosamine [3]. La chitine est le 2eme polymère naturel le plus abondant (après le cellulose). Il est entre autres présent dans la carapace des crustacés.

Le CS est biodégradable et biocompatible [3, 4]. Il est utilisé pour de nombreuses applications biomédicales [5], telles la livraison de médicament, la thérapie génique, l'ingénierie tissulaire [6], ou encore la réparation de plaies [7]. Son potentiel dans ces domaines variés provient de son affinité pour les cellules et les facteurs de croissance, qui est supérieure à celle d'autres polymères naturels [8] ainsi que de ses propriétés antimicrobiennes, hémostatiques et analgésiques [9]. Cette affinité provient du caractère cationique du CS. Ce caractère cationique est particulier, car la majorité des polymères naturels sont neutres ou anioniques [3]. Le CS a également un impact sur la cascade de coagulation : il promeut l'activité des plaquettes (agrégation et dé-granulation) et la formation de caillots sanguins [10]. Il est cependant important de noter que le poids moléculaire (Mn) et le degré de déacétylation (DDa) du CS ont un impact direct sur la réponse immunitaire et varient selon les applications [6].

Le PRP est un orthobiologique, c'est-à-dire un produit biologique utilisé en chirurgie orthopédique pour favoriser la réparation des tissus musculo-squelettiques. Le PRP, obtenu par centrifugation du sang complet (WB), présente une concentration en plaquettes plusieurs fois

plus élevée que celle du WB [11]. Une fois activées, ces plaquettes relarguent des facteurs de croissance et des cytokines [12], stimulant ainsi la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire [13]. Le PRP est donc utilisé pour délivrer des facteurs de croissance issus des plaquettes pour des applications diverses [14]. Cependant, malgré ses applications potentielles dans la promotion de la réparation tissulaire, son efficacité demeure un sujet de débat dans la littérature en raison du manque de preuves cliniques suffisantes pour l'étayer [15]. Les variations observées dans les techniques de séparation des plaquettes, les formulations du PRP utilisées, ainsi que sa stabilité *in vivo* sont des éléments contribuant probablement à la variabilité des résultats documentés dans la littérature scientifique [15, 16]. Le caillot obtenu à partir de PRP est physiquement instable post-coagulation : il se rétracte significativement pour atteindre une fraction du volume sanguin initial et est susceptible de lyse dans une variété d'environnements physiologiques.

Cependant, les recherches antérieures du LBC montrent que l'adjonction de CS améliore la stabilité du PRP, générant ainsi un implant plus résistant, qui ne se rétracte pas. Nous pensons qu'utiliser du PRP plutôt que du WB pour réhydrater le FD CS, augmente la bioactivité de l'implant, grâce à l'augmentation de la concentration en facteurs de croissance dérivés des plaquettes [2]. Il est donc attendu que la réparation des tissus mous en soit améliorée [2].

Cette hypothèse a été confirmée par plusieurs études animales, qui ont démontré que les implants CS-PRP sont biodégradables, biocompatibles et efficaces pour stimuler la réparation du tendon supra-épineux (SST) de l'épaule, du cartilage et du ménisque dans de petits et grands modèles animaux, car ils favorisent le recrutement cellulaire, la vascularisation, le remodelage et la réparation tissulaire [16–18]. Pour ces études, l'amélioration de la réparation a été analysée par histologie et par microtomographie assistée par ordinateur (μCT), mais aucun test mécanique sur les tissus régénérés n'a été effectué.

Les études menées par le LBC sur les implants CS-PRP ont aussi permis les observations suivantes :

— L'implant hybride obtenu se solidifie lentement, spécifiquement avec du PRP d'origine humaine. Lorsqu'il est appliqué directement après avoir été réhydraté, l'humidité présente au site de la plaie peut donc empêcher le biomatériau d'adhérer au site d'injection. Actuellement, le biomatériau doit alors être incubé dans une seringue pendant 30 à 45 minutes avant d'atteindre une viscosité adaptée à l'injection [1]. Le LBC souhaite donc développer une nouvelle formulation du biomatériau, ayant une solidification rapide et

1. Cette procédure a du être appliquée lors d'un essai clinique multicentrique, prospectif et randomisé sur la coiffe des rotateurs démarré en 2023 (ClinicalTrials.gov, numéro NCT05333211, Sponsor : ChitogenX Inc.)

contrôlée pour faciliter sa manipulation et son administration.

— La répartition homogène du CS au sein du caillot hybride n'est pas garantie et dépend au moins de sa Mn : une répartition homogène n'est obtenue qu'avec un CS de Mn moyenne (28-56 kilodalton (kDa)). Une Mn plus élevée mène à de larges agrégats de CS tandis qu'une Mn plus faible mène à une séparation de phase entre le CS et le PRP [2]. Une faible homogénéité pourrait affecter les propriétés mécaniques et la biodégradabilité de l'implant, ainsi que la réponse tissulaire associée [19]. Avant de modifier la formulation des implants hybrides, le LBC désire pouvoir quantifier l'homogénéité des implants hybrides pour les comparer de façon rigoureuse et répétable.

1.2 Objectif général

L'objectif de la présente thèse est d'améliorer de façon significative la formulation des implants CS-PRP pour faciliter son utilisation clinique. Cela mènera à une amélioration des procédures actuelles de chirurgie orthopédique et augmentera ainsi leur taux de succès.

Dans le premier article, une définition de l'homogénéité est proposée, et un algorithme est développé pour sa quantification. Cet algorithme a été implémenté au sein d'une application disponible en Matlab™ et Python. Il est utilisé dans les deux articles subséquents.

Dans le second article, une nouvelle formulation de l'implant CS-PRP a été développée, optimisée et testée *in vitro* et *ex vivo*. La prothrombine (FII) y est utilisée pour obtenir des implants dont la coagulation est accélérée. La réhydratation dans le PRP mène à l'obtention de FIIa au sein des caillots hybrides (CS-FIIa-PRP).

Dans le troisième article, la formulation CS-FIIa-PRP est testée *in vivo* chez le lapin pour étudier comment elle améliore la réparation transosseuse du tendon supra-épineux de la coiffe des rotateurs (analyse mécanique, histologie et μCT). Un modèle de déchirure de la coiffe des rotateurs a été choisi car il s'agit de l'application la plus avancée du biomatériau CS-PRP (version sans FIIa).

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Fil conducteur

Des blessures de l'épaule, les déchirures de la coiffe des rotateurs (RC) sont celles pour lesquelles les patients sollicitent le plus fréquemment une intervention chirurgicale. Cependant, les tendons possèdent des caractéristiques intrinsèques complexes (section 2.2) et une très faible capacité de régénération. Le taux d'échec des chirurgies est donc actuellement très élevé, indiquant qu'elles ne répondent pas adéquatement aux besoins actuels. Cela conduit à un développement actif de nouvelles solutions proposées dans la littérature scientifique (section 2.3). C'est dans ce cadre que notre laboratoire a mis au point un biomatériau hybride à base de CS et de PRP (section 2.4), une combinaison qui a déjà fait ses preuves dans la littérature (section 2.5).

Cependant, nous souhaitons que ce biomatériau, qui est liquide au moment de l'application, se solidifie plus rapidement. Pour ce faire, il est crucial de comprendre la cascade de coagulation et de sélectionner le facteur de coagulation approprié (section 2.6).

Nous devons également évaluer l'homogénéité du biomatériau, car cela influence ses propriétés (section 2.7). À cet effet, un algorithme de quantification de l'homogénéité a été développé.

Une fois le biomatériau conçu *in vitro*, il est nécessaire de le tester *in vivo*. Le choix du modèle animal est crucial pour cette phase d'évaluation (section 2.8). Enfin, après avoir réalisé l'étude animale, les résultats doivent être analysés sous les angles mécanique (section 2.9), osseux (section 2.10) et histologique (section 2.11).

2.2 Blessures musculo-squelettiques et coiffe des rotateurs

2.2.1 Blessures musculo-squelettiques : définition et enjeux

Le système musculo-squelettique désigne les muscles, les os, le cartilage, les ligaments et les tendons, ainsi que leurs interactions complexes. C'est lui qui supporte notre corps et lui permet de bouger. Chaque composant du système musculo-squelettique possède une structure et des fonctions qui lui sont propres [20].

Les blessures musculo-squelettiques désignent des conditions variées qui peuvent entraîner des douleurs et une perte de fonction. Elles comptent parmi les affections les plus invalidantes et les plus coûteuses aux États-Unis [21]. Au Canada, elles affectent 11 millions de personnes

âgées de 12 ans et plus chaque année, soit une personne sur 3. Ces conditions peuvent résulter de processus pathologiques héréditaires, congénitaux ou acquis. Ces processus peuvent :

— être infectieux, inflammatoires ou dégénératifs ;

— résulter de traumas ou se développer progressivement ;

— résulter de maladies néoplasiques, vasculaires ou toxiques/métaboliques [21].

Les blessures musculo-squelettiques entraînent un fardeau sociétal majeur, car elles sont source de douleur et mènent à une forme d'invalidité chez les patients, diminuant leur qualité de vie. Elles entraînent fréquemment à des arrêts de travail et des coûts de traitement élevés [22]. Au total, les coûts liés aux blessures musculo-squelettiques s'élèvent à $37 milliards chaque année au Canada.

Parmi les blessures musculo-squelettiques, on retrouve entre autres les déchirures de la coiffe des rotateurs, les déchirures du ménisque et les lésions du cartilage. La prévalence, le nombre annuel de chirurgies aux États-Unis et le taux d'échec associé à chacune de ces pathologies sont renseignés au Tableau 2.1

Tableau 2.1 Prévalence, nombre annuel de chirurgies et taux d'échec pour 3 blessures musculo-squelettiques fréquentes

Pathologie	Prévalence	Nombre annuel de chirurgies (US)	Taux d'échec
Déchirure de la coiffe des rotateurs	10-60% [23] [1]	560.000	20-60%
Déchirure du ménisque	12-15% [24]	1.200.000	20-40%
Lésion du cartilage	36% chez les athlètes [25]	200.000	13-35%

Les déchirures de la coiffe des rotateurs constituent la condition de l'épaule pour laquelle les patients recherchent le plus couramment un traitement [26]. Les déchirures de la coiffe des rotateurs sont une source de morbidité importante pour les patients puisqu'elles entraînent généralement des douleurs à l'épaule, une raideur, une faiblesse et une perte de mouvement. Une prise en charge non-opératoire (réadaptation) peut être utilisée dans le cas de patients présentant des exigences moindres. Cependant, comme les déchirures de la coiffe des rotateurs ne guérissent pas spontanément, un traitement chirurgical devient souvent impératif pour les patients présentant des symptômes persistants. Des résultats cliniques satisfaisants ont été rapportés, en particulier chez les patients plus jeunes souffrant de déchirures traumatiques [27], mais les taux d'échec postopératoire se situent tout de même en moyenne entre 20 et

1. Sa prévalence est d'environ 10% chez les moins de 20 ans, mais supérieure à 30% chez les plus de 40 ans, et allant jusqu'à 60% chez les plus de 80 ans

60% [1]. Un problème majeur est que les tendons de la coiffe des rotateurs subissent des changements dégénératifs mais ont une capacité limitée à se régénérer, car ils sont faiblement vascularisés [28].

2.2.2 Anatomie de la coiffe des rotateurs chez l'homme

L'épaule comprend trois os : l'humérus ("humerus"), l'omoplate ("scapula") et la clavicule ("clavicle") (Figure 2.1). La tête sphérique de l'humérus s'insère dans une cavité de l'omoplate, la cavité glénoïdale, formant une articulation sphéroïde. La petite taille de la cavité glénoïdale par rapport à la tête humérale permet à l'épaule une grande amplitude de mouvements, mais rend l'articulation hautement instable. La principale source de stabilité de l'articulation gléno-humérale est la coiffe des rotateurs [29]. La coiffe des rotateurs est composée de quatre ensembles muscle-tendon qui maintiennent par pression la tête de l'humérus dans la cavité glénoïdale de l'omoplate (Figure 2.2). Les tendons de ces muscles forment une "coiffe" autour de l'articulation gléno-humérale. Pendant le mouvement, la contraction de ces muscles empêche la tête humérale de glisser hors de la cavité en contrôlant précisément son mouvement. Ces quatre muscles facilitent également les mouvements d'abduction et de rotation médiale et latérale. Les muscles de la coiffe des rotateurs sont [29] :

— Le sous-scapulaire (subscapularis), facilitant la rotation médiale de l'épaule.

— Le supra-épineux (supraspinatus), facilitant l'abduction du bras. Il passe entre la tête humérale et l'arche coraco-acromiale située juste au-dessus de la tête humérale. Cette arche est formée de l'acromion et du coracoïde, deux protubérances de l'épine de l'omoplate (voir Figure 2.1) et du ligament coraco-acromial qui les lie. Un faisceau du muscle deltoïde est attaché à l'acromion, couvrant l'insertion du supra-épineux sur l'humérus.

— Le sous-épineux (infraspinatus), facilitant la rotation latérale de l'épaule.

— Le petit-rond (teres minor), facilitant également la rotation latérale de l'épaule.

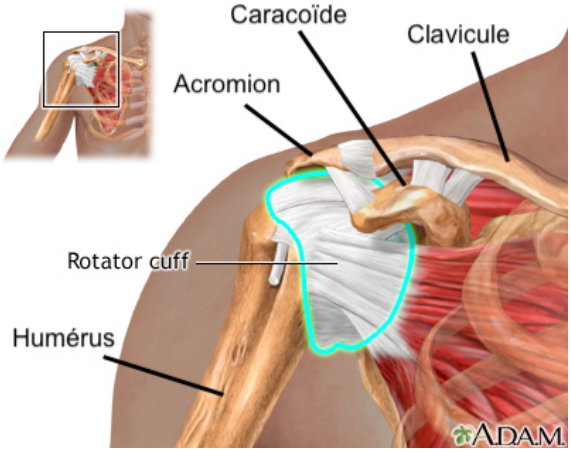


FIGURE 2.1 Les trois os de l'épaule sont l'humérus (humerus), l'omoplate (scapula) et la clavicule (clavicle). Image issue de la "National library of medicine" (en ligne) [30].

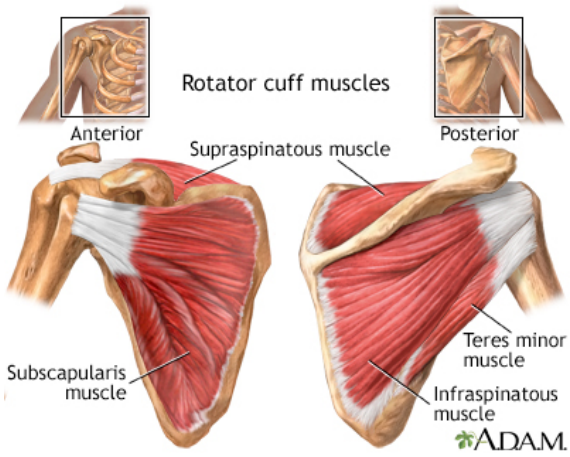


FIGURE 2.2 La coiffe des rotateurs permet la stabilité de l'épaule en maintenant la tête humérale dans la cavité glénoïdale de l'omoplate. Les muscles de la coiffe des rotateurs sont le sous-scapulaire, le supra-épineux, le sous-épineux et le petit-rond. Image issue de la "National library of medicine" (en ligne) [31].

La déchirure de la coiffe des rotateurs fait référence à une déchirure partielle ou totale de l'un ou plusieurs des quatre ensembles muscle-tendon qui la composent [32]. On distingue les ruptures partielles qui endommagent le tendon sans le rompre complètement, et les ruptures complètes qui séparent le tendon de l'os [33]. La plupart des déchirures de la coiffe des rotateurs sont dégénératives et concernent le tendon supra-épineux [34]. Elles mènent à des changements structurels comme une accumulation de graisse dans le muscle, une perte de volume musculaire, un remodelage musculaire et une diminution du nombre de sarcomères [28].

La cause d'une déchirure de la coiffe des rotateurs est considérée comme une combinaison de facteurs extrinsèques et intrinsèques [35]. Les facteurs extrinsèques mènent à une compression du tendon. On peut citer le frottement répété entre l'acromion et le supra-épineux (phénomène appelé "conflit sous-acromial") et le frottement répété entre le tendon supra-épineux et le bord de la cavité glénoïde (souvent dû à une activité sportive ou professionnelle continue) [35]. Les facteurs intrinsèques mènent à une dégénération directe du tendon. On peut citer le soulèvement d'objets lourds ou une dégénération fonctionnelle et structurelle du tendon liée à l'âge (p. ex. augmentation du nombre de fibres de collagène et de leur diamètre, mais diminution de leur renouvellement) [35]. Une suite d'évènements typiques menant à une

déchirure de la coiffe des rotateurs commence par une inflammation du tendon augmentant son volume, ce qui induit son frottement contre l'acromion, entraînant sa calcification, sa dégénération puis sa rupture [29]. Il s'agit donc ici d'une blessure progressive apparaissant sans trauma. Elle est dite "chronique". Les déchirures de la coiffe des rotateurs peuvent également être "aiguës" et apparaître directement après un trauma. Les principaux facteurs de risque de la déchirure de la coiffe des rotateurs sont l'âge, les mouvements répétés d'élévation du bras au-dessus de la tête et les antécédents traumatiques [36]. Les principaux symptômes d'une déchirure de la coiffe des rotateurs sont la douleur au niveau de l'articulation (aussi bien au repos que pendant certains mouvements), la faiblesse et une diminution de l'amplitude de mouvements [32].

2.2.3 Structure du tendon sain et de l'enthèse

Le rôle des tendons est de transmettre à l'os la force générée par le muscle. Pour remplir cette fonction, les tendons sont dotés d'une grande résistance mécanique et d'une haute élasticité. Les tendons sont principalement constitués de collagène, de protéoglycanes, d'eau et de cellules (30% de masse sèche et 70% d'eau [37]). C'est le collagène de type I qui est le composant le plus abondant de la matrice extracellulaire des tendons (il représente 60% de la masse sèche et 95% du collagène). Les tendons contiennent également du collagène de type III et V [37]. Ce collagène procure la stabilité mécanique aux tendons, et constitue une réserve d'énergie élastique [38]. La présence d'élastine (2% de la masse sèche) procure aux tendons son élasticité initiale. Le type cellulaire le plus abondant au sein des tendons est les ténocytes, une population de cellules semblable aux fibroblastes. Ces cellules représentent 90 à 95% des cellules des tendons et se trouvent orientées longitudinalement entre les fibres de collagène. Elles sont principalement responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire (y compris le collagène), de la maintenance des tendons, de son remodelage et de sa réparation. Des cellules souches tendineuses sont également éparpillées en faible quantité au sein de la matrice extracellulaire. Ce sont des cellules souches adultes qui se différencient en ténocytes en condition physiologique normale [38].

Les tendons normaux possèdent une structure hiérarchisée : les molécules de collagène s'assemblent en microfibrilles, qui s'assemblent elles-mêmes en fibrilles. Les fibrilles se réunissent pour former des fibres. Un ensemble de fibres forme alors un faisceau, entouré d'une gaine appelée "endoténon". Les faisceaux sont alignés dans l'axe longitudinal des tendons et sont responsables de leur haute résistance à la traction [37]. Ils sont eux-mêmes entourés d'une gaine appelée "épitenon". L'endoténon et l'épiténon contiennent des vaisseaux sanguins, des nerfs et des vaisseaux lymphatiques. Finalement, le "paraténon" est une couche de tissu

conjonctif située autour de l'épiténon. Elle permet de réduire la friction entre un tendon et les tissus adjacents. La structure hiérarchisée du tendon est schématisée à la Figure 2.3.

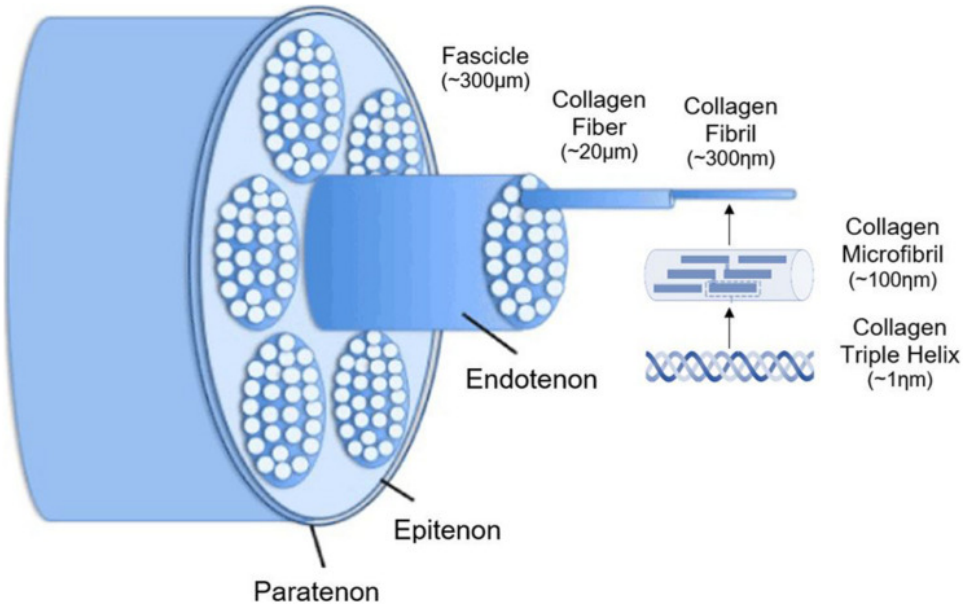


FIGURE 2.3 Schéma de la structure hiérarchisée des tendons. Image issue de Meeremans *et al.* [39].

Les forces appliquées aux tendons entraînent une modification de l'organisation de leurs fibres. La courbe contrainte-déformation d'un tendon est caractérisée par trois phases (voir Figure 2.4) :

- La première phase est appelée "toe region" (région pied). Son allure exponentielle caractérise le "dépliement" progressif des fibres de collagène. Cette mise en tension est réversible.
- Lorsque toutes les fibres sont tendues, la relation contrainte-déformation entre dans une phase linéaire. Au cours de cette phase, lorsque la tension augmente, les molécules se décalent et l'espace entre elles augmente. Cette élongation est réversible. Ce processus explique que la force de résistance d'un tendon soit proportionnelle à son diamètre et à sa densité en collagène [37].
- La troisième phase débute à $\sim 4\%$ d'élongation. Le tendon se déforme ici de façon irréversible et subit des ruptures à l'échelle microscopique. Au-delà de 8-10% d'élongation, des lésions macroscopiques apparaissent et on parle de phase de rupture. La rupture du ligament surgit rapidement après les premières lésions macroscopiques [37].

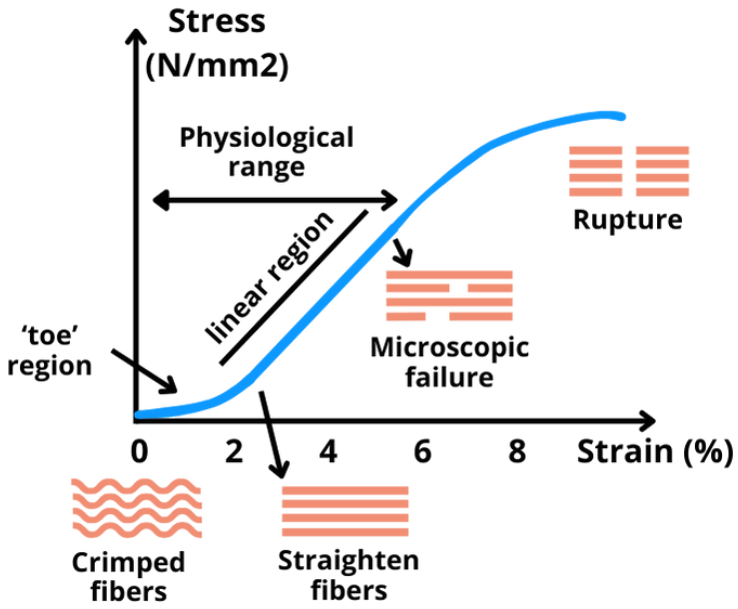


FIGURE 2.4 La courbe contrainte-déformation du tendon présente typiquement 3 zones : la région pied, la zone physiologique (ou linéaire) et la zone de rupture.

La structure du corps du tendon (appelée partie moyenne) est cependant différente de celle de l'interface tendon-os, appelée enthèse. La résistance de l'enthèse à un chargement est 4 fois supérieure à celle de la partie moyenne du tendon. La microstructure du tissu natif de l'enthèse est adaptée au transfert de force entre le muscle et l'os. Elle est typiquement composée de 4 zones distinctes permettant une calcification progressive du tissu (Figure 2.5) [40, 41] :

- La partie moyenne du tendon, décrite ci-dessus, contient des ténocytes et du collagène de type I, III et V.
- Le fibrocartilage déminéralisé, contenant des chondrocytes (cellules composant le cartilage), des glycosaminoglycanes et du collagène de type I et III. Cette zone agit comme un amortisseur et dissipe les contraintes générées par la flexion des fibres de collagène.
- Le fibrocartilage minéralisé, contenant des chondrocytes et du collagène de type I et II.
- L'os, contenant des ostéocytes, ostéoclastes, ostéoblastes et du collagène de type I.

La transition du fibrocartilage déminéralisé vers le fibrocartilage minéralisé représente la frontière entre les tissus "mous" et les tissus "durs". Cette frontière est souvent appelée "tidemark". Cependant, la structure native de l'enthèse ne se reforme pas à l'identique après la chirurgie (Figure 2.6) [42]. L'enthèse obtenue après chirurgie est composée de tissu cicatriciel fibrovasculaire uniquement, sans formation d'une zone intermédiaire fibrocartilagineuse entre l'os et le tendon [40]. Ce tissu cicatriciel fibrovasculaire a des propriétés mécaniques inférieures

à celle du tissu fibrocartilagineux natif [43]. Il est donc prédisposé à se déchirer à nouveau. Ceci explique le taux d'échec postopératoire important, situé entre 20 et 60% en fonction de la taille de la déchirure, du temps passé entre le moment de la blessure et la chirurgie, de la qualité du tendon, de la technique chirurgicale utilisée, etc. [28]. En particulier, 50% des patients ayant subi une chirurgie pour une déchirure complète de la coiffe des rotateurs montrent des symptômes d'échec à peine 6 mois après la chirurgie [44]. La compréhension des facteurs biologiques impliqués dans la réparation du tendon supra-épineux présente un grand intérêt pour la littérature, car elle pourrait permettre d'identifier des méthodes menant à la régénération de la microstructure et de la composition native de l'enthèse [42].

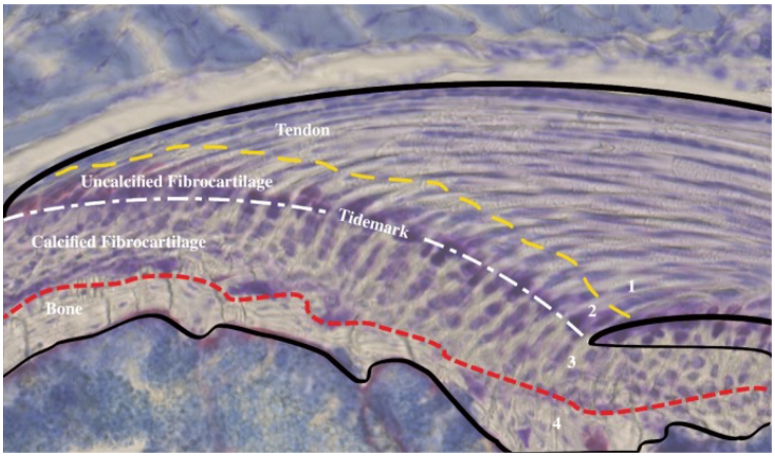


FIGURE 2.5 Coupe histologique de l'enthèse du tendon supra-épineux natif chez la souris. 4 zones sont observées. Les protéoglycanes, le fibrocartilage déminéralisé et le fibrocartilage minéralisé sont colorés en mauve, permettant d'observer le gradient structurel caractéristique de l'enthèse. Image issue de Apostolakos *et al.* [41].

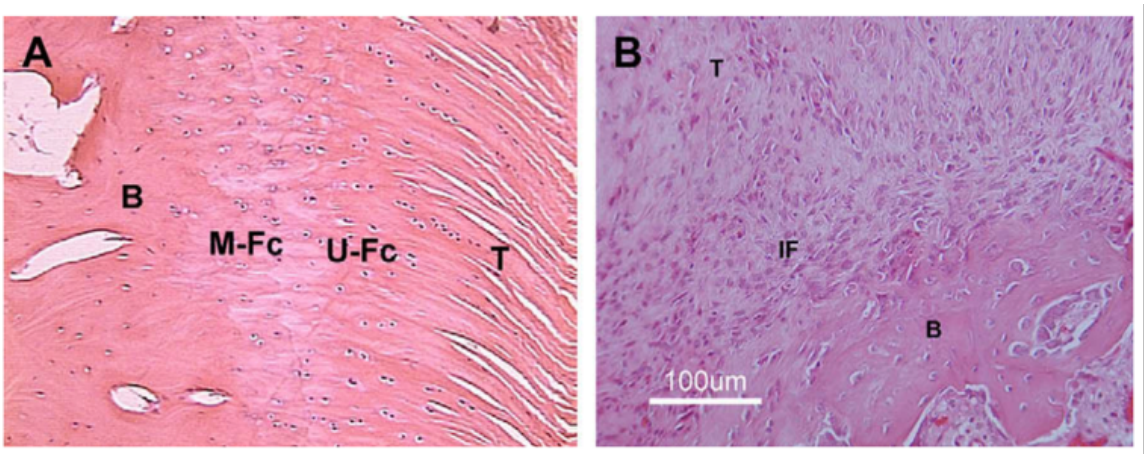


FIGURE 2.6 A) Coupe histologique de l'enthèse du tendon supra-épineux natif chez le lapin. 4 zones sont observées : T, le tendon, U-Fc, le fibrocartilage déminéralisé, M-Fc, le fibrocartilage minéralisé et B, l'os. B) Coupe histologique de l'enthèse du tendon supra-épineux 4 semaines après une chirurgie de la coiffe des rotateurs chez le rat. Le site d'attachement montre une interface nette formée de tissu cicatriciel fibrovaculaire, IF, sans formation d'une zone intermédiaire fibrocartilagineuse entre l'os (B) et le tendon (T). Reproduit de L. V. Gulotta et S. A. Rodeo, "Growth factors for rotator cuff repair," *Clinics in sports medicine*, vol. 28, no. 1, p. 13–23, 2009, avec la permission de Elsevier [40].

2.2.4 Mécanisme de réparation des tendons

Actuellement, nous avons une compréhension limitée des mécanismes impliqués dans les blessures et la réparation des tendons [45]. La guérison des tendons chez l'Homme semble se dérouler en trois phases qui se chevauchent [46] :

1. Phase inflammatoire initiale : Elle commence 3 à 7 jours après la blessure. Elle débute par la phagocytose des tissus nécrotiques, qui dure environ 24h. Les monocytes et les macrophages sont alors les types cellulaires prédominants. Ensuite, les érythrocytes et les cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles, migrent vers le site de la blessure. Ils proviennent des tissus péritendineux extrinsèques, comme la gaine du tendon, le périoste, les tissus sous-cutanés, l'épiténon et l'endoténon [47]. Un hématome se forme suite à l'activation des plaquettes. La sécrétion de facteurs vasoactifs augmente la perméabilité vasculaire et amorce l'angiogenèse [48]. La sécrétion de facteurs chimiotactiques induit le recrutement de cellules inflammatoires supplémentaires et la prolifération des ténocytes [48]. Ces ténocytes migrent vers l'hématome et synthétisent du collagène de type III [49].
2. Phase de formation : Elle commence quelques jours après la blessure et dure environ 8 semaines [50]. La synthèse du collagène de type III par les fibroblastes atteint son

apogée, augmentant progressivement la résistance mécanique du tendon [51]. Le tendon peut alors être chargé mécaniquement et se déformer. Ce chargement influence le processus de réparation, entre autres l'orientation des fibres de collagène synthétisées. Progressivement, la production de collagène de type I prend le relais sur celle de type III. Le tissu de réparation atteint sa taille maximale. Le tissu est toujours faible mécaniquement, mais sa surface transversale augmentée permet de compenser cette faiblesse. Le tendon peut ainsi tout de même supporter des chargements importants en traction [50]. Pendant 5 semaines environ, du collagène est continuellement produit par les ténocytes, qui sont alors le type cellulaire prédominant. La concentration en glycosaminoglycanes reste élevée durant toute la phase de formation et les cellules prolifèrent [49].

3. Phase de remodelage : Elle commence environ 6 semaines après la blessure et correspond au redimensionnement et au remodelage du tissu de réparation. Les fibres de collagène de type III sont dégradées et remplacées par d'autres, mieux organisées selon l'axe de chargement du tendon [52]. Les liaisons entre fibres augmentent, ainsi que la synthèse de collagène de type I [53]. La quantité de cellules et de glycosaminoglycanes diminue, ainsi que la vascularisation [54]. La surface transversale du tissu de réparation diminue également au fur et à mesure que les propriétés mécaniques du tendon augmentent [51]. Cette phase dure plusieurs mois, voire années. Cependant, malgré ce remodelage, le tendon ne retrouve jamais ses propriétés initiales : le tissu reste hypercellularisé et les fibrilles de collagène sont plus fines, expliquant les propriétés mécaniques inférieures à celles du tissu sain [55].

Ces trois phases sont résumées à la Figure 2.7.

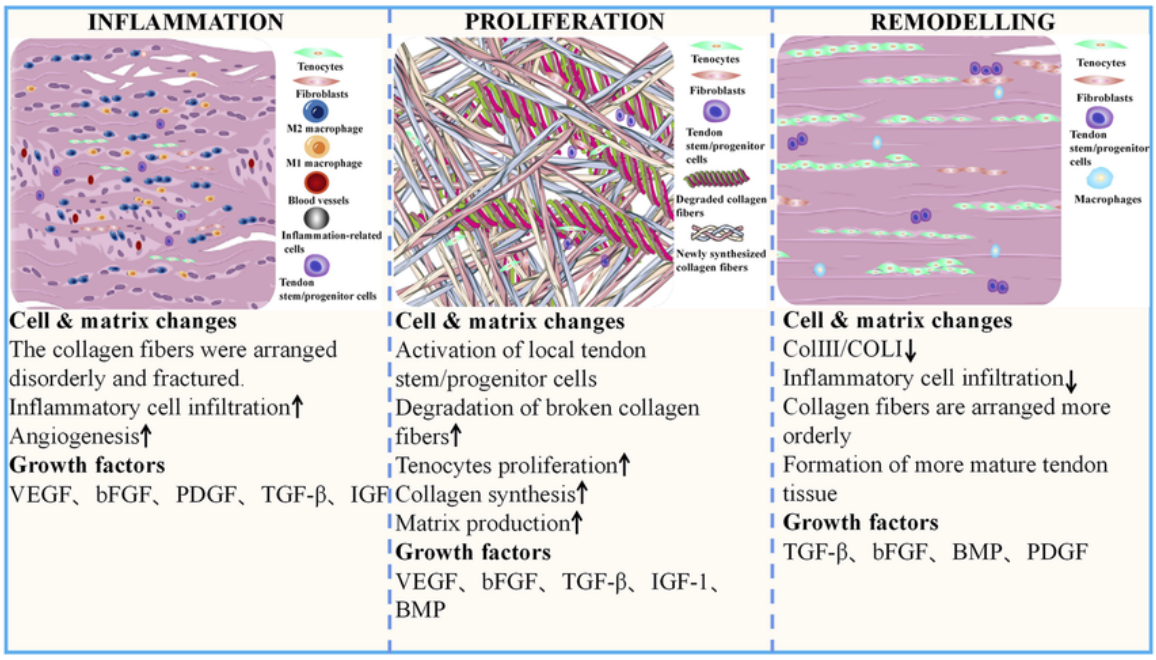


FIGURE 2.7 Les trois phases de la réparation des tendons : Phase inflammatoire, phase de formation et phase de remodelage. Chaque phase implique des cellules et des facteurs de croissances spécifiques, dont découlent des changements structurels qui lui sont propres. Image issue de Lin *et al.* [56].

La guérison du tendon peut se faire de manière intrinsèque ou extrinsèque [57]. La guérison intrinsèque, initiée par les ténocytes de l'épiténon et de l'endoténon, est caractérisée par une prolifération et une migration cellulaire, et produit un collagène plus mature, ce qui améliore la biomécanique et réduit les complications, en préservant le glissement normal du tendon [58, 59]. En revanche, la guérison extrinsèque dépend de l'invasion des cellules de la gaine et du synovium environnant, entraînant souvent la formation d'adhérences aux structures adjacentes, ce qui perturbe le glissement du tendon. La guérison extrinsèque semble prédominer pour les déchirures de la coiffe des rotateurs pour laquelle de l'adhérence aux tissus adjacents est largement observée [60, 61]. La contribution relative des différents types cellulaires et la qualité de la réparation peuvent être influencées par le type de traumatisme, la position anatomique, la présence de gaine synoviale, et le stress mécanique post-réparation [62].

De nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans la réparation des tendons. Ceux-ci comprennent le BMP, l'EGF, le FGF1, le FGF2, l'IGF-I, l'IGF-II, le PDGF-AA, le PDGF-BB, le PDGF-AB, et le TGF-β [51]. Ils peuvent être produits localement par les cellules dans la zone de réparation, ou être délivrés par le sang. Leur action précise n'est pas claire, mais les études ont montré que, pour la réparation de la coiffe des rotateurs, ils influencent la

prolifération et la migration des fibroblastes tendineux, des chondroblastes et des ostéoblastes, stimulent la formation osseuse, la production de matrice, la synthèse du collagène et le type de collagène, la différenciation cellulaire, la vasculogenèse et l'angiogenèse [51].

L'utilisation de facteurs de croissance semble améliorer la réparation de l'enthèse dans des modèles animaux *in vivo* [51]. Cependant, il est peu probable qu'un tissu puisse guérir par l'application d'un seul facteur de croissance. D'où le grand intérêt du PRP, puisqu'il inclut de nombreux facteurs de croissance identifiés précédemment comme cruciaux dans la guérison normale du tendon et de l'enthèse : TGF-β, bFGF, PDGF, VEGF, CTGF et EGF [63].

2.2.5 Chirurgie de la coiffe des rotateurs

Pour 80% des patients, des traitements non chirurgicaux suffisent à soulager la douleur et restaurer les fonctions de l'articulation [64]. Ces traitements incluent le repos, une modification des activités physiques, des thérapies physiques pour renforcer l'articulation ou une injection de stéroïdes [32]. Malgré cela, pour ces patients, la taille de la déchirure peut augmenter avec le temps. Environ 50% des déchirures dégénératives vont voir leur taille augmenter dans les 5 ans, pouvant entraîner une dégénération musculaire [65].

Pour les autres patients, les médecins recommandent la chirurgie. Il s'agit majoritairement de jeunes patients ayant subi une blessure aiguë, pour qui les traitements non chirurgicaux ne parviennent pas à diminuer la douleur, ou de patients utilisant très activement le mouvement d'abduction pour mener leur bras au-dessus de leur tête (activité sportive ou professionnelle) [65]. Au total, il est estimé qu'environ 250.000 chirurgies de la coiffe des rotateurs sont effectuées chaque année aux États-Unis [42]. La procédure standard de réparation d'une déchirure de la coiffe des rotateurs est la suture du tendon à la tête de l'humérus d'où il s'est détaché. Ces sutures peuvent être de plusieurs types, mais elles s'attachent toutes à des ancres pénétrant l'os. Les trois types de chirurgies les plus fréquentes sont :

— La chirurgie arthroscopique. Le chirurgien insère, par de petites incisions, une caméra (arthroscope) et des instruments chirurgicaux miniatures dans l'articulation (Figure 2.8). Il peut alors observer la lésion sur un écran et guider les instruments pour effectuer la suture Figure 2.9). Le chirurgien ne voit donc la lésion qu'au travers de l'écran, ce qui permet à la chirurgie d'être minimalement invasive. La chirurgie se fait en milieu humide : l'endroit à suturer est irrigué avec une solution permettant la création d'un volume de travail et une meilleure visualisation de la lésion. Les avantages de cette technique sont la diminution du risque de complication (morbidité du deltoïde), la diminution de la douleur postopératoire et la rapidité de réhabilitation [66]. Les procédures arthroscopiques sont le standard actuel pour la plupart des déchirures [28]. Cependant,

certains chirurgiens critiquent le manque de données sur le long terme et la difficulté technique de la procédure [66].

— La chirurgie “mini-open”. Elle combine la chirurgie arthroscopique avec une incision de 1-2 cm pour écarter les fibres du muscle deltoïde permettant un accès plus facile au tendon abimé [66]. Cette chirurgie est préférée à la chirurgie arthroscopique par certains chirurgiens au vu de la difficulté technique associée à la chirurgie arthroscopique [67].

— La chirurgie ouverte. Plus ancienne, cette chirurgie est toujours utilisée pour les déchirements étendus [68]. Elle nécessite une incision de plusieurs centimètres et le détachement du muscle deltoïde pour permettre au chirurgien de voir et accéder au tendon déchiré [68]. C’est donc une chirurgie invasive. Ses désavantages sont une possible diminution (voire une perte) de fonction du muscle deltoïde et une douleur post-opérative supérieure à celle de la chirurgie arthroscopique [66].

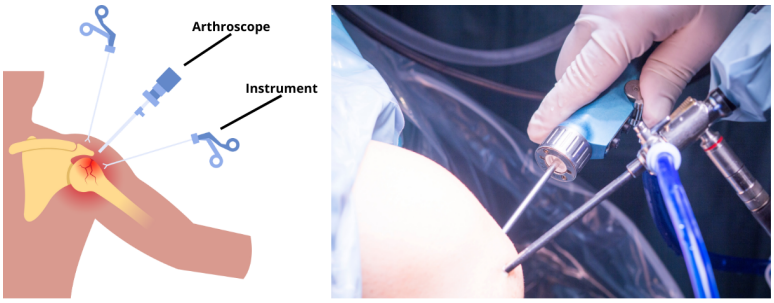


FIGURE 2.8 Chirurgie arthroscopique. Insertion d’une caméra et d’instruments chirurgicaux dans l’articulation par de petites incisions. Gauche : schéma pour la coiffe des rotateurs. Droite : chirurgie arthroscopique du genou.

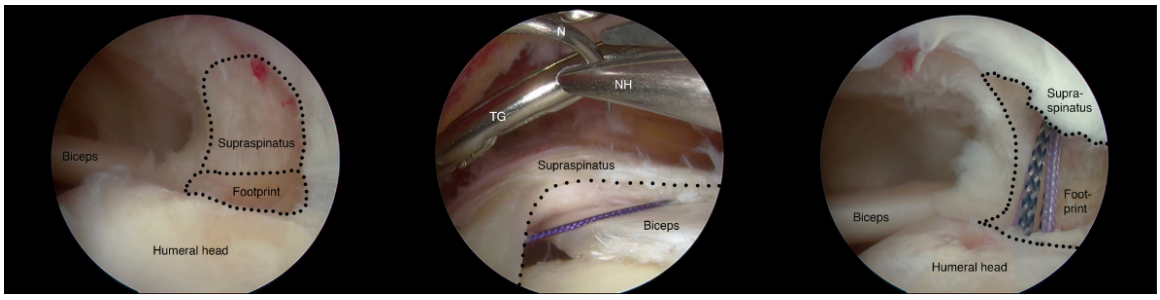


FIGURE 2.9 Vue arthroscopique (par voie latérale) de l’espace sous-acromial. Gauche : Rupture partielle du SST. Milieu : Aiguille (N), suture (bleue), porte-aiguille (NH) et pince (TG) nécessaires pour effectuer la réparation. Droite : Une vis d’ancrage de suture en titane a été insérée dans l’os.

2.3 Technologies d'augmentation en développement pour la réparation de la coiffe des rotateurs

De nombreuses techniques ont été développées ou sont en développement pour tenter de diminuer le taux d'échec postopératoire de la réparation de la coiffe des rotateurs. Certaines d'entre elles concernent directement la procédure chirurgicale, mais d'autres visent plutôt à augmenter la réparation en ajoutant des étapes additionnelles aux chirurgies préexistantes [69]. Les stratégies d'augmentation les plus fréquentes sont les stratégies cellulaires et les "patchs" [69].

La stratégie cellulaire la plus explorée dans la littérature est l'utilisation de plasma riche en plaquettes (PRP) [69]. Toutefois, son efficacité pour la réparation de la coiffe des rotateurs fait débat [28]. Le PRP est un plasma sanguin enrichi en plaquettes par centrifugation. Plusieurs types de PRP ont été utilisés comme stratégie d'augmentation :

— Le PRP peut être appliqué sous forme liquide ou sous forme de matrice solide. Pour être maintenu liquide, des anticoagulants doivent lui être ajoutés. L'ajout de calcium ou de thrombine juste avant l'application permet alors de réactiver la coagulation. Sous forme solide, on parle plutôt de fibrine riche en plaquettes (PRF). Dans le cas du PRF, le sang est collecté sans utiliser d'anticoagulant et est immédiatement centrifugé.

— Le PRP peut ou non contenir des leucocytes, dépendamment de la technique d'isolation. On parle alors de PRP riche en leucocytes (LR-PRP) ou de PRP pauvre en leucocytes (LP-PRP).

Les plaquettes relarguent des facteurs de croissance, y compris des cytokines et des facteurs bioactifs ayant un rôle chimiotactique et régulant l'inflammation, l'angiogenèse, la synthèse matricielle et le remodelage des tissus [28]. Il a été postulé dans la littérature que le PRP améliore la réparation du tendon en augmentant la concentration de facteurs de croissance et en promouvant la revascularisation des tissus qui l'entourent [28]. Cependant, les résultats obtenus lors d'études cliniques sont pour le moment mitigés pour tous les types de PRP : certaines études cliniques ont démontré une diminution du taux de redéchirure de la coiffe des rotateurs lors de l'utilisation du PRP (p. ex. Jo *et al.* [70]), d'autres n'ont détecté aucune différence avec le traitement standard (p. ex. Moraes *et al.* [71]). Il en va de même pour les études précliniques, principalement réalisées chez le rat [28]. Une revue de littérature interne au LBC compare les résultats obtenus par 26 études cliniques de la coiffe des rotateurs utilisant le PRP comme stratégie d'augmentation (4 études utilisent le LR-PRP, 13 le L-PRP, 3 le LR-PRF et 6 le LP-PRF).

— 12 études ne rapportent aucun effet du PRP (0 avec LR-PRP, 7 avec LP-PRP, 2 avec LR-PRF, 3 avec LP-PRF).

— 12 rapportent une amélioration suite à l'utilisation de PRP (4 avec LR-PRP, 6 avec LP-PRP, 1 avec LR-PRF, 1 avec LP-PRF).

— 2 rapportent des effets négatifs suite à l'utilisation du PRP (2 avec LP-PRF).

Ces études ne permettent ni de démontrer l'efficacité du PRP ni de démontrer qu'un type de PRP est supérieur à un autre. Cependant, le taux de succès est plus élevé pour les études qui utilisent le LR-PRP (4 études sur 4 montrent une amélioration) que pour les études qui utilisent le LP-PRP (6 études sur 13 montrent une amélioration). Pour cette raison, le LBC utilise du LR-PRP pour réhydrater le CS.

La diminution du taux de redéchirure observée dans certains cas pourrait se traduire par une meilleure réparation sur le long terme, indiquant que le PRP pourrait améliorer la réparation de la coiffe des rotateurs [28]. Déterminer l'efficacité du PRP sur base des études effectuées dans la littérature est particulièrement difficile, car les PRPs utilisés varient en nombre de plaquettes, en technique de centrifugation, en méthode d'application, en concentration de facteurs de croissance, en concentration en leucocytes, en activation plaquettaire, etc. [28]. L'efficacité du PRP pour la réparation de la coiffe des rotateurs demeure donc une question ouverte actuellement dans la littérature.

Une autre stratégie d'augmentation est l'utilisation de patchs. Les patchs pour tendon sont utilisés comme matrices guidant la croissance tissulaire et comme substituts au collagène. Ils devraient augmenter la contrainte à la rupture des tissus réparés, ainsi que diminuer le phénomène de "stress-shielding" (diminution de la masse osseuse suite au placement d'un implant qui soulage l'os de certaines contraintes) [28]. Plusieurs patchs sont disponibles sur le marché. Ils sont synthétiques, biosynthétiques ou biologiques. Les patchs biologiques sont les plus utilisés, en particulier les allogreffes cadavériques dermales [69]. Cependant, les résultats des études effectuées sur les différents types de patchs sont mitigés [28]. Davantage d'études sont nécessaires pour prouver leur efficacité.

Parmi les autres techniques d'augmentation proposées dans la littérature, on peut citer :

— La combinaison de cellules et d'une matrice. Plusieurs études précliniques ont démontré une augmentation de la proportion de collagène de type I lors de réparation de la coiffe des rotateurs utilisant des cellules souches issues de la moelle osseuse implantées sur une matrice (p. ex. Kim *et al.* ont utilisé une matrice d'acide L-lactic [72] et Yokoya *et al.* ont utilisé une matrice d'acide polyglycolique [73]). Cependant, pour que cette stratégie soit adoptée pour la réparation de la coiffe des rotateurs, une combinaison optimale de matrice et de cellules doit être déterminée [28].

— L'utilisation de cellules souches. L'idée est ici d'utiliser des cellules souches mésenchymateuses multi- ou pluripotentes pour qu'elles se différentient en tissus du mésoderme

et forment une enthèse similaire à celle existant initialement [74]. Des études animales ont démontré des résultats encourageants d'un point de vue histologique et biomécanique [74]. Des cellules souches provenant de différents tissus ont été utilisées, et certaines semblent mener à des résultats supérieurs [74]. Cette stratégie est récente pour la réparation de la coiffe des rotateurs.

— L'utilisation de facteurs de croissance et de cytokines. Les facteurs de croissance peuvent améliorer la réparation et la régénération tissulaire, mais davantage d'études cliniques sont nécessaires pour établir le moment de livraison optimal, le dosage, ainsi que la méthode de livraison [28]. Par exemple, les facteurs de croissance transformants TGF-β1 et TGF-β3 ont été utilisés pour la réparation du tendon supra-épineux chez le rat. L'utilisation de TGF-β1 a mené à une augmentation du collagène de type III et à une diminution des propriétés mécaniques tandis que l'utilisation de TGF-β3 n'a pas mené à une différence par rapport aux contrôles [75]. Actuellement, aucune étude clinique n'a utilisé de facteurs de croissance et de cytokines pour la réparation de la coiffe des rotateurs.

— L'utilisation de chitine et de CS. Les études utilisant la chitine et le CS pour la réparation de la coiffe des rotateurs sont peu nombreuses, mais prometteuses. Funakoshi *et al.* ont utilisé de la chitine comme matrice acellulaire et ont montré que son utilisation permet d'augmenter la densité cellulaire, d'augmenter l'alignement des fibres de collagène et d'améliorer les propriétés biomécaniques du tendon sous-épineux régénéré lors d'une étude sur le lapin [76]. Melamed *et al.* ont montré que l'utilisation d'un gel de CS augmente le nombre de fibroblastes et diminue l'infiltration graisseuse au site de la blessure [77]. Robinson *et al.* ont également utilisé un gel de CS et ont démontré qu'il améliorait la réparation du tendon et empêchait l'atrophie musculaire [78]. Finalement, le LBC a développé une formulation lyophilisée de CS soluble dans le PRP qui forme un implant CS-PRP injectable qui coagule rapidement *in situ*, se rétracte moins que le PRP seul et montre une activité biologique significative *in vivo* [3]. Cette formulation et les études animales sur la coiffe des rotateurs qui lui sont associées sont développées dans le paragraphe suivant.

TABLEAU 2.2 Stratégies d'augmentation pour la réparation de la coiffe des rotateurs et leurs résultats

Stratégie	Description	Résultats/Études
Plasma Riche en Plaquettes	Plasma sanguin enrichi en plaquettes par centrifugation, appliqué sous forme liquide (PRP) ou solide (PRF) et avec/sans leucocytes.	Les résultats cliniques sont mitigés. Exemples : Jo *et al.* [70], Moraes *et al.* [71].
Patchs	Matrices pour guider la croissance tissulaire et diminuer le "stress-shielding", utilisés comme substituts au collagène.	Résultats mitigés selon les études. Exemples : Bond *et al.* [79], Metcalf *et al.* [80].
Combinaison de cellules et matrice	Utilisation de cellules souches sur des matrices (ex. acide L-lactic, acide polyglycolique).	Ces stratégies semblent mener à une augmentation du collagène de type I. Exemples : Kim *et al.* [72], Yokoya *et al.* [73].
Cellules souches	Cellules souches mésenchymateuses pour la formation de tissus similaires à l'enthèse.	Études animales prometteuses au niveau de la cicatrisation et de la biomécanique. Exemple : Hernigou *et al.* [74].
Facteurs de croissance et cytokines	Utilisation de TGF-β1 et TGF-β3 pour améliorer la régénération tissulaire.	Exemples : études chez le rat avec TGF-β1 augmentant le collagène de type III mais diminuant les propriétés mécaniques (Exemple : Murphy *et al.* [75]), tandis que TGF-β3 n'a pas montré de différence significative.
Chitine et chitosane	Matrice acellulaire de chitine, gel de chitosane, formulations lyophilisées de chitosane	Études animales peu nombreuses mais prometteuses (amélioration des propriétés mécaniques, augmentation des fibroblastes). Exemples : Funakoshi *et al.* [76], Melamed *et al.* [77].

2.4 Biomatériau hybride CS-PRP

2.4.1 Généralités sur le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire composé de glucosamines et de N-acétyl-glucosamines aléatoirement réparties. Il est obtenu par N-déacétilation de la chitine (Figure 2.10), polymère présent dans la carapace des crustacés et obtenu principalement à partir de résidus de l'industrie alimentaire. Les principaux paramètres physicochimiques du CS sont sa masse molaire (Mn) et son degré de déacétylation (DDA). Le DDA correspond au nombre d'unités acétylées par rapport au nombre d'unités totales. Par convention, au-dessous de 50% DDA, on parle de chitine, et au-delà, on parle de CS. La Mn du CS peut être ajustée

par dépolymérisation acide en partant d'une molécule de plus de 1.000.000 Da jusqu'à un oligomère de 1000 Da [6].

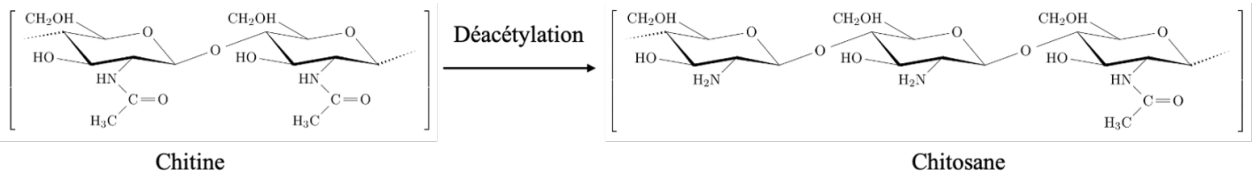


FIGURE 2.10 Structure de la chitine et exemple de structure du chitosane.

La chitine est insoluble. La présence de groupement NH_2 sur les glucosamines rend la molécule de CS soluble. Elle forme une solution visqueuse dans l'acide acétique (ou autres acides organiques) pour des valeurs de pH en dessous de 6 [81]. Les groupements NH_2 sont alors convertis en une forme protonée soluble ; NH_3^+. Le CS chargé positivement a une plus haute affinité pour les cellules et les facteurs de croissance que d'autres polymères naturels, probablement grâce aux interactions charge-charge [8]. En effet, le CS est le seul polysaccharide naturel que nous ayons découvert qui possède une charge positive lorsque son groupement amine est protoné [8].

2.4.2 Propriétés du chitosane en génie tissulaire

En plus de son affinité pour les cellules et facteurs de croissance, le CS est biodégradable et biocompatible. Il possède de nombreuses applications médicales [82]. Parmi celles-ci, on peut citer le transport de médicaments, les vaccins, la thérapie génique et l'ingénierie tissulaire (pour une variété de tissus) [6]. Le CS peut prendre de nombreuses formes. Son utilisation en médecine peut être sous forme de liquide, de poudre, de microparticules, de films, de matrice poreuse, etc [6].

La forme du CS et ses paramètres chimiques influencent la réponse immunitaire [6]. Par exemple, la vitesse à laquelle il se dégrade dépend entre autres de son DDa et de sa Mn [83]. Le CS influence la cascade de coagulation de deux façons : en facilitant le processus d'hémagglutination (agglutination des globules rouges) et en promouvant l'activation des plaquettes [6].

La présence de cellules inflammatoires est l'une des réponses les plus observées *in vivo* suite à l'implantation de CS de Mn variée ayant entre 70% et 92% DDA. En particulier, on observe la présence de cellules polymorphonucléaires (PMN), principalement des neutrophiles [84]. Tout comme les neutrophiles, des macrophages sont également recrutés pour dégrader les

implants de CS. Ces macrophages peuvent rester au site d'implantation jusqu'à la dégradation complète du CS [6]. Les macrophages sont capables d'adopter différents phénotypes en fonction de leur environnement (concept appelé "polarisation" des macrophages). Le CS peut recruter des macrophages de phénotype pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2) et le nombre de macrophages recruté peut être influencé par la technique d'implantation, le DDA, la stabilité de l'implant et la durée depuis implantation [6]. De plus, la quantité de CS implantée détermine l'ampleur et la durée de la réponse inflammatoire [6].

Par exemple, les études sur CarGel, une forme liquide de CS mélangée à du sang développée par le LBC, montrent qu'un CS de 80% DDA implanté en sous-cutané chez le lapin attire un grand nombre de neutrophiles au jour 1 et une accumulation de neutrophiles et de macrophages de type M2 après 1 semaine, comparé à une implantation de sang seul [85]. La polarisation M1 est déclenchée par la présence de pathogène tandis que la polarisation M2 intervient plutôt lorsque la réponse inflammatoire diminue. Les macrophages M2 expriment un niveau faible de facteurs pro-inflammatoires et sécrètent davantage de facteurs anti-inflammatoires. Ils relarguent également du TGF-β [6].

2.4.3 Propriétés de l'implant hybride CS-PRP

L'implant développé par le LBC est une formulation lyophilisée composée de CS, de tréhalose (il stabilise les protéines durant la lyophilisation) et de chlorure de calcium (il permet de réenclancher la coagulation au contact du PRP). Ce biomatériau se présente sous forme d'une éponge poreuse destinée à être réhydratée dans du PRP autologue, formant un implant visqueux injectable, qui coagule *in situ* (voir Figure 2.11).

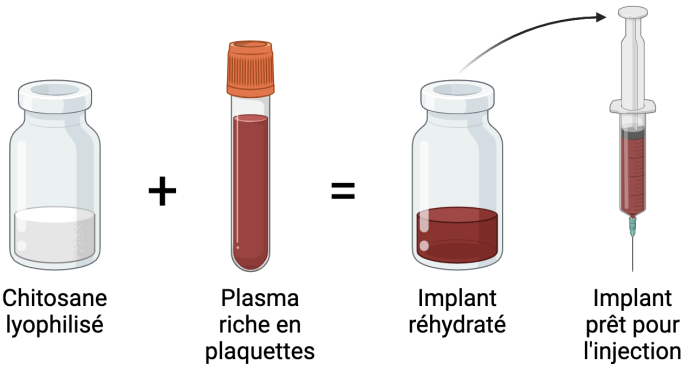


FIGURE 2.11 Le chitosane lyophilisé forme une éponge poreuse destinée à être réhydratée dans du plasma riche en plaquettes, formant un implant injectable. Image réalisée avec le logiciel BioRender.

Une fois le PRP isolé, l'implant de CS est réhydraté dans le PRP par un mélange manuel vigoureux de 20-30 secondes. L'implant doit 1) se solubiliser rapidement et complètement dans le PRP, 2) avoir des propriétés visqueuses après coagulation, pour être plus facile à appliquer durant la chirurgie arthroscopique, car celle-ci se fait en milieu humide et il faut éviter que le produit ne soit emporté par le fluide utilisé, et 3) coaguler rapidement pour former un implant hybride stable et homogène.

Les propriétés de l'implant de CS dépendent entre autres de trois paramètres : La Mn du CS, la concentration en CS et la concentration en lyoprotectant (tréhalose). La composition de l'implant de CS a été déterminée lors d'une étude réalisée par le LBC et décrite dans Chevrier *et al.* [2], utilisant des chitosanes ayant un DDA entre 80 et 85%, au cours de laquelle les trois paramètres cités ont été modifiés de façon systématique. L'étude a montré que :

1. Quand la concentration en lyoprotectant augmente, la rétraction de l'implant après lyophilisation diminue, mais la coagulation est altérée si cette concentration dépasse 6%.
2. La dispersion du CS parmi les composés sanguins dépend fortement de la Mn du CS (voir Figure 2.12). Trois groupes ont été testés : faibles masses molaires (entre 4 et 11 kDa), masses molaires moyennes (entre 28 et 56 kDa) et hautes masses molaires (entre 79 et 154 kDa). La dispersion n'est homogène que pour les masses molaires moyennes. Les Mn élevées et basses ont donc été abandonnées.
3. Les formulations contenant des Mn et des concentrations faibles ou moyennes de CS se solubilisent rapidement et complètement dans le PRP. Trois concentrations ont été testées : 0,56% (w/v), 1% (w/v) et 1,5% (w/v). Les concentrations contenant 1,5% (w/v) ne sont que partiellement solubles et ont donc été abandonnées.
4. L'osmolalité [2] des formulations CS-PRP augmente avec la concentration en lyoprotectant (l'osmolalité varie entre 1.4 fois et plus de 2 fois celle du PRP). Le pH des formulations varie entre 6,75 et 7,11.
5. Les formulations CS-PRP sont plus visqueuses que le PRP seul (PRP recalcifié). De plus, augmenter la Mn du CS ou sa concentration augmente la viscosité de la formulation, ce qui facilite la manipulation de l'implant.
6. Le PRP humain seul montre une rétraction d'un facteur 5 entre le volume du caillot et le volume sanguin initial. Celle-ci est presque entièrement bloquée lors de la solidification du caillot CS-PRP (voir Figure 2.13). Les formulations contenant la plus haute concentration en lyoprotectant et en CS sont celles qui se rétractent le moins.
7. Augmenter la concentration en lyoprotectant diminue la résistance du caillot.

2. L'osmolalité est la mesure du nombre de moles dissoutes de soluté par Kg de solution

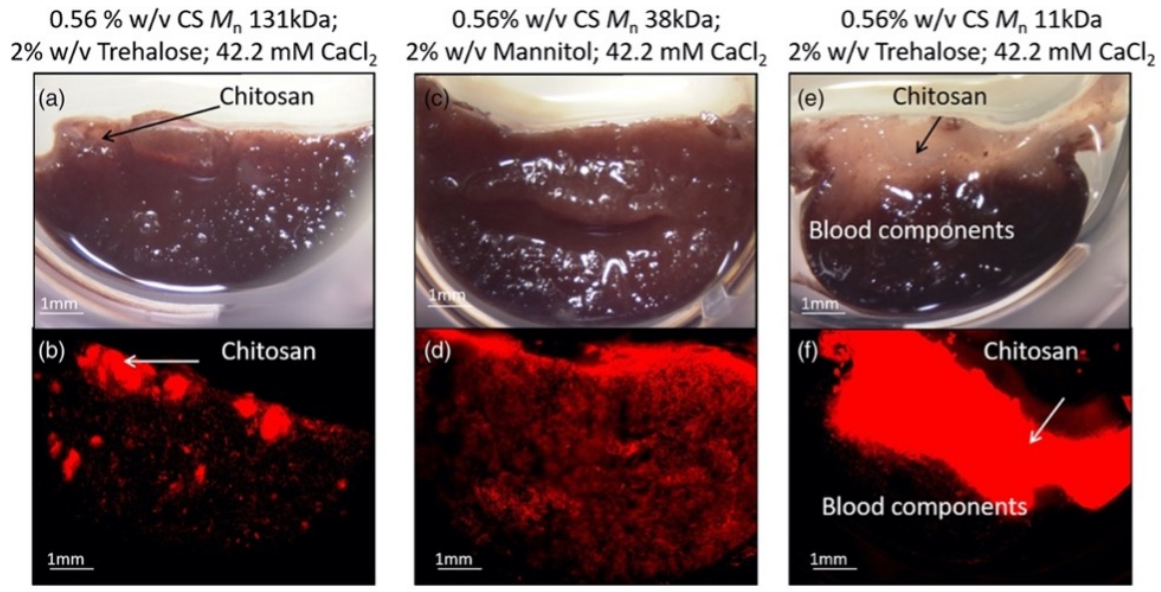


FIGURE 2.12 La dispersion du chitosane parmi les composés sanguins varie en fonction de sa masse molaire. (a, b) La dispersion du CS n'est pas homogène parmi les composés sanguins lorsque du CS de haute Mn est utilisé. De larges agrégats de CS sont visibles. (c, d) La dispersion du CS est homogène lorsque des Mn intermédiaires de CS sont utilisées. (e, f) La dispersion du CS n'est pas homogène lorsque de petites Mn sont utilisées. On observe alors une séparation de phases. (Le CS est rendu visible sous fluorescence rouge par ajout d'un traceur rhodamine-CS aux formulations avant lyophilisation). Image issue de Chevrier *et al.* [2].

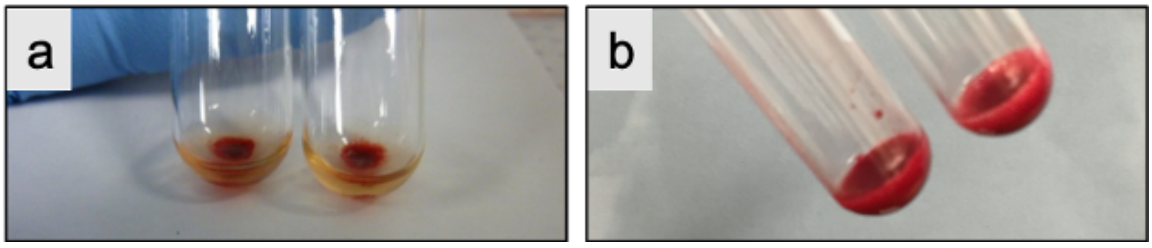


FIGURE 2.13 A) Le PRP seul coagule en se contractant. B) Combiné au CS, le PRP coagule pour former un caillot sans perte de volume.

Une étude a ensuite été réalisée pour observer la réponse *in vivo* aux implants CS-PRP. Cette étude est également décrite dans Chevrier *et al.* [2]. Un total de 8 formulations a été injecté de façon sous-cutanée dans le dos de 11 lapins. Les formulations contenaient une concentration en chitosane faible (0,56% [w/v]) ou moyenne (1% [w/v]) et une concentration en lyoprotectant de 1, 2, 4 ou 6% (w/v). Les animaux ont été sacrifiés aux jours 1, 3, 7 et 14.

Cette étude a montré que l'implant CS-PRP était toujours présent 14 jours après implantation alors que les contrôles contenant uniquement du PRP avaient presque complètement disparu après le premier jour. De plus les implants CS-PRP ont provoqué un recrutement cellulaire et de l'angiogenèse. En comparaison, le PRP seul a montré une très faible activité biologique. La concentration en CS ou en lyoprotectant n'a eu aucun effet sur le recrutement cellulaire.

Au vu des observations effectuées *in vitro* et *in vivo*, les implants sont actuellement réalisés avec du CS de ∼40 kDa et une concentration finale de 1% (w/v) CS, 1% (w/v) tréhalose comme lyoprotectant. Ils contiennent en outre 42.2 mM de chlorure de calcium comme agent solidifiant (activateur de la coagulation). Ceci permet d'obtenir un implant qui se solubilise rapidement et complètement dans le PRP, qui ait des propriétés visqueuses après solubilisation et qui coagule rapidement pour former un implant hybride stable et homogène.

Plusieurs études *in vivo* ont ensuite été réalisées pour analyser la capacité des formulations CS-PRP à améliorer la réparation de la coiffe des rotateurs.

Une première étude a été réalisée par Deprés-Tremblay *et al.* chez le lapin [16]. Des déchirures complètes bilatérales ont été induites sur le tendon supra-épineux (n = 4 pour une étude pilote de faisabilité et n=13 pour l'étude de plus grande ampleur) puis directement réparées par des sutures transosseuses. Seul un côté est traité avec la formulation d'implant CS-PRP injectée dans le tunnel transosseux et sur le tendon. L'autre côté est un contrôle. La réparation est analysée histologiquement à différents temps (1, 7 et 14 jours puis 2 mois après la chirurgie). Les implants CS-PRP ont induit le recrutement de cellules polymorphonucléaires (PMNs) du jour 1 au jour 14, indiquant le déroulement de la phase inflammatoire (les PMNs contribuent à la dégradation de l'implant). L'étude a montré que l'implant était contenu au site de l'injection. À deux mois, la dégradation de l'implant était toujours en cours pour un tiers des épaules traitées.

Les implants CS-PRP ont amélioré l'attachement du tendon supra-épineux à la tête humérale en augmentant le remodelage osseux de la grosse tubérosité de l'humérus. Ils ont également inhibé l'ossification hétérotopique (HO) du tendon à deux mois. L'HO est une formation anormale d'os lamellaire mature dans les tissus mous. Il s'agit d'une complication fréquente suivant les procédures chirurgicales ou les blessures traumatiques (voir section 2.10.5).

De plus, aucun effet négatif n'a été observé lors de l'utilisation des implants CS-PRP, attestant que l'utilisation de l'implant est sans danger. Cette étude préliminaire a donc pu montrer que les implants CS-PRP pourraient être efficaces pour améliorer l'attachement du tendon lors d'une réparation de la coiffe des rotateurs sur un petit modèle animal.

Le LBC a ensuite réalisé trois études sur des brebis pour analyser l'utilisation des implants

CS-PRP pour traiter un déchirement de la coiffe des rotateurs chez un grand animal.

La première étude a établi la supériorité du modèle de déchirure aiguë sur le modèle de déchirure chronique de la coiffe des rotateurs chez la brebis (étude sur 8 brebis). Le modèle aigu est vu comme plus fiable et facilement reproductible [86].

La deuxième étude compare la réparation de la coiffe des rotateurs pour le traitement standard seul (n=6 brebis) ou pour le traitement standard en présence de 1 mL d'implant CS-PRP (n=6) ou de 2 mL d'implant CS-PRP (n=6) réhydraté dans le PRP. Les tendons ont été observés par imagerie à résonance magnétique (IRM) avant l'opération ainsi qu'aux semaines 6 et 12 postopératoires. Les animaux ont été sacrifiés à la semaine 12 postopératoire et l'histologie des tissus a été réalisée. Cette étude a montré que le traitement standard avec 2 mL d'implant CS-PRP améliore l'organisation structurelle du tendon (présence de faisceaux de collagène) et l'apparence structurelle de l'enthèse comparé aux contrôles. L'analyse par IRM a démontré que le traitement a permis, après 3 mois, de rétablir une structure plus proche de la structure native du tendon [87].

Une troisième étude a ensuite été réalisée sur 48 brebis pour comparer 4 groupes : le traitement standard seul, le traitement standard en présence d'un implant CS-PRP de 2 mL ou de 3 mL et le traitement standard en présence de 3 mL de matrice de CS réhydratée dans l'eau [88]. Les tendons ont été observés par imagerie à résonance magnétique (IRM) aux mois 3 et 6 postopératoires. Les animaux ont été sacrifiés au mois 6 postopératoire et l'histologie des tissus a été réalisée. Cette étude a permis de montrer que le traitement standard avec 2 mL ou 3 mL d'implant améliore l'organisation structurelle du tendon et l'apparence structurelle de l'enthèse comparé aux contrôles et à l'implant réhydraté dans l'eau, confirmant les résultats de l'étude précédente. De plus, l'analyse par IRM a démontré que la dose de 3 mL a permis de rétablir une structure plus proche de la structure native du tendon que celle de 2 mL. Après 6 mois, aucun signe de cellule inflammatoire et une plus faible cellularité sont observés en présence de l'implant CS-PRP comparé aux contrôles (41,7% des contrôles présentent des signes d'inflammation). Cette étude a également permis de montrer que l'implant est bien toléré par la brebis jusqu'à 6 mois.

Les principales études réalisées sur l'implant CS-PRP sont résumées au Tableau 2.3.

TABLEAU 2.3 Résumé des principales études réalisées sur les implants CS-PRP.

Étude	Modèle	Objectifs et Méthodologie	Principaux Résultats
Chevrier *et al.* 2018 [2]	*In vitro* et lapin (n=11)	Étudier l'effet de la Mn du CS, la concentration en CS et celle en lyoprotectant sur les propriétés de l'implant	Formulation optimale de CS : Mn ∼ 40 kDa, 1% CS, 1% tréhalose ; amélioration de la stabilité et de la viscosité ; réponse *in vivo* montre une persistance de l'implant et recrutement cellulaire.
Deprés-Tremblay *et al.* 2019 [16]	Lapin (n=13)	Étudier l'effet de l'implant CS-PRP sur la réparation de la coiffe des rotateurs	Recrutement de PMNs jusqu'à 14 jours ; amélioration de l'attachement du tendon à l'os ; inhibition de l'ossification hétérotopique.
Chevrier *et al.* 2020 [87]	Brebis (n=22)	Comparer la réparation standard seule avec l'ajout de 1 mL ou 2 mL de CS-PRP	2 mL de CS-PRP améliore la structure du tendon et l'enthèse, IRM montre une meilleure restauration de la structure après 3 mois.
Chevrier *et al.* 2022 [88]	Brebis (n=48)	Comparer 4 groupes : traitement standard, 2 mL CS-PRP, 3 mL CS-PRP, 3 mL CS réhydraté dans l'eau	Les formulations CS-PRP optimisent la structure tendineuse et l'enthèse après 6 mois ; absence de signes inflammatoires, bonne tolérance à l'implant jusqu'à 6 mois.

2.5 Autres biomatériaux à base de chitosane et de dérivés sanguins

Le chitosane, lorsqu'il est combiné avec des dérivés sanguins comme le PRP ou le plasma riche en fibrine (PRF), donne naissance à des biomatériaux efficaces pour diverses réparations, telles que la régénération osseuse, la guérison des plaies et les ulcères diabétiques. Voici quelques exemples prometteurs tirés de la littérature. Ces exemples sont également résumés dans le tableau 2.4.

Gan *et al.* [89] ont développé un hydrogel composite à base de chitosane carboxyméthylé méthacryloyle (CMCSMA) et de gélatine méthacryloyle (GelMA), incorporant du PRF lyophilisé, qui favorise la guérison osseuse. Le PRF, tout comme le PRP, est instable in vivo, mais il sert de vecteur autologue de facteurs de croissance pour la régénération des tissus.

Le matériau développé permet une libération prolongée des facteurs de croissance. Il possède une bonne biocompatibilité, améliore l'adhésion et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses de rat (BMSCs).

Javaid *et al.* [90] ont comparé l'effet du PRP-chitosane et du PRF-chitosane sur la guérison de fractures osseuses chez le lapin. Le PRF-chitosane a montré de meilleurs résultats, notamment pour les niveaux de phosphatase alcaline et de calcium, bien que l'étude présente des limitations, notamment l'absence de tests mécaniques.

Rastegar *et al.* [91] ont développé un échafaudage nanofibreux PCL/chitosane chargé de PRF, favorisant la différenciation ostéogénique des cellules souches humaines. Cet échafaudage a montré, *in vitro*, une bonne élasticité et une libération contrôlée du PRF, améliorant l'ostéoconductivité et la croissance cellulaire.

Pan *et al.* [92] ont conçu un biomatériau combinant des nanofeuilles de phosphore noir et un hydrogel à base de chitosane et de PRP pour traiter la polyarthrite rhumatoïde. Ce système génère de la chaleur et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour éliminer les tissus synoviaux inflammés, tout en favorisant l'adhésion des cellules souches et protégeant le cartilage articulaire. Il a été étudié *in vitro* et *in vivo* chez la souris.

Mohammadi *et al.* [93] ont montré que la combinaison de PRP et de chitosane améliorait la cicatrisation des plaies profondes chez le rat, en réduisant significativement la taille des plaies et en favorisant la production d'hydroxyproline.

Wu *et al.* [94] ont utilisé du PRP activé par du chitosane pour améliorer la fonction érectile après une lésion des nerfs caverneux chez des rats, en préservant les neurones et en favorisant la régénération des axones myélinisés.

Yuan *et al.* [95] ont développé des films composites de chitosane et de collagène chargés de PRP, favorisant la régénération nerveuse dans un modèle de lésion du nerf sciatique chez le rat. Ces films ont amélioré la prolifération des cellules de Schwann et accéléré la récupération fonctionnelle.

Qian *et al.* [96] ont conçu un hydrogel injectable à base de chitosane, fibroïne de soie et PRP pour favoriser la cicatrisation des plaies diabétiques. Ce biomatériau stimule la prolifération cellulaire et améliore la réparation tissulaire chez le rat.

Zhang *et al.* [97] ont développé un hydrogel injectable à base de chitosane carboxyméthylé et de sulfate de chondroïtine oxydée, qui permet la libération contrôlée du PRP. Il accélère la guérison des plaies diabétiques en stimulant la formation de collagène et l'angiogenèse chez le rat.

Ces études montrent le potentiel des biomatériaux à base de chitosane et de dérivés sanguins

pour diverses applications médicales.

TABLEAU 2.4 Résumé des études sur la combinaison de chitosane et de dérivés sanguins pour différentes applications.

Étude	Biomatériau	Application	Résultats
Gan et al. (2023)	Hydrogel chitosane carboxyméthylé méthacryloyle, gélatine méthacryloyle et PRF	Régénération osseuse	Libération prolongée de facteurs de croissance, accélération de la guérison osseuse, amélioration de l'adhésion, prolifération, migration et différenciation des cellules souches chez le rat.
Javaid et al. (2024)	PRP-chitosane, PRF-chitosane	Régénération osseuse	PRF-chitosane plus efficace que PRP-chitosane, amélioration des niveaux de phosphatase alcaline et de calcium chez le lapin.
Rastegar et al. (2021)	Échafaudage PCL/chitosane chargé de PRF	Régénération osseuse	Meilleure élasticité et surface spécifique, libération lente du PRF, meilleure croissance osseuse et différenciation des cellules souches *in vitro*.
Pan et al. (2020)	Nanofeuilles de phosphore noir (BPNs), hydrogel thermosensible chitosane, PRP	Polyarthrite rhumatoïde (PR)	Réduction de l'œdème articulaire, amélioration de l'adhésion cellulaire et protection du cartilage chez la souris.
Mohammadi et al. (2016)	Film biodégradable de chitosane, PRP	Cicatrisation des plaies profondes	Amélioration significative de la réduction des plaies, des niveaux d'hydroxyproline et des paramètres biomécaniques chez le rat.
Wu et al. (2022)	PRP activé par chitosane (cPRP)	Récupération de la fonction érectile après lésion des nerfs caverneux	Amélioration de la fonction érectile, préservation des neurones, accélération de la régénération des axones chez le rat.
Yuan et al. (2023)	Film COL/CS (collagène/chitosane), gel PRP	Réparation des lésions des nerfs périphériques	Amélioration de la régénération nerveuse, meilleure prolifération des cellules de Schwann chez le rat.
Qian et al. (2020)	Hydrogel injectable composé de chitosane, de fibroïne de soie et de PRP	Traitement des plaies diabétiques	Protection du PRP de l'hydrolyse, stimulation de la prolifération cellulaire, accélération de la guérison des plaies chez le rat.
Zhang et al. (2023)	Hydrogel chitosane carboxyméthylé, sulfate de chondroïtine oxydée, PRP	Traitement des plaies diabétiques	Libération contrôlée du PRP, réduction de l'inflammation, accélération de la cicatrisation des plaies chez le rat.

2.6 Solidification de l'implant et cascade de coagulation

2.6.1 Cascade de coagulation

Spontanément, le sang a tendance à se solidifier. Un grand nombre d'enzymes et de cofacteurs présent dans la circulation sanguine permet de le maintenir à l'état liquide (p. ex. héparine, prostaglandine). *In vivo*, la cascade de coagulation est issue d'un équilibre entre la voie "pro-coagulante" responsable de la formation du caillot, et les mécanismes d'inhibition présents au-delà du site de la blessure. Les acteurs principaux de la cascade de coagulation sont appelés "facteurs de coagulation" et interagissent de façon complexe pour mener ultimement à la conversion du fibrinogène soluble en fibrine insoluble, formant le caillot. Le fibrinogène, produit par le foie, est donc une protéine essentielle à la coagulation. La plupart des facteurs de coagulation sont des précurseurs d'enzymes protéolytiques (enzymes qui permettent de briser les liaisons peptidiques de protéines), appelés zymogènes ou proenzymes. Ils circulent sous une forme inactive. Ils sont généralement identifiés par un chiffre romain, à côté duquel est ajouté le suffixe "a" lorsque le zymogène est activé. La coagulation est un processus dynamique et complexe dont la compréhension et la représentation ont grandement évolué au cours du temps [98]. Traditionnellement, la cascade de coagulation est séparée en deux voies : intrinsèque et extrinsèque. Cette classification permet d'expliquer les observations effectuées *in vitro*, mais ne correspond pas à un nombre important d'observations effectuées *in vivo* [99]. De plus, cette théorie ne permet pas d'intégrer le rôle central joué par les surfaces cellulaires dans la coagulation (plaquettes, cellules endothéliales, cellules extravasculaires) [100]. Un autre modèle, plus récent, a donc été proposé. Les deux modèles sont ci-après exposés de façon simplifiée.

Représentation traditionnelle

Les voies intrinsèques et extrinsèques mènent toutes deux à l'activation du facteur X.

— Voie extrinsèque : elle est activée par le facteur tissulaire (TF), aussi appelé facteur III. Le TF est une glycoprotéine procoagulante présente dans les tissus subendothéliaux et les fibroblastes. Lorsqu'un dommage est fait à la vasculature, le TF est exposé à la circulation sanguine. Il se lie alors au facteur VIIa et au calcium, formant un complexe qui permet l'activation du facteur X [101].

— Voie intrinsèque : elle démarre avec l'activation du facteur XII suite à l'ajout en solution de phospholipide, de calcium et d'une substance chargée négativement. Le FXIIa permet l'activation du facteur XI qui va activer le facteur IX. Le IXa et son cofacteur (le facteur VIII) forment un complexe (complexe tenase) qui active le facteur X [102].

Une fois le facteur X activé, il forme le complexe prothrombinase avec son cofacteur (le facteur V), du calcium et des phospholipides (plaquettaires ou tissulaire). Ce complexe prothrombinase convertit alors la prothrombine en thrombine (facteur IIa). La thrombine clive le fibrinogène circulant en fibrine et active le facteur XIII qui réticule la fibrine, la rendant insoluble. Ce réseau de fibrine permet la stabilisation du caillot initialement formé par les plaquettes [102].

Représentation moderne

Actuellement, la littérature pense que les deux voies décrites ne sont pas indépendantes et que la voie intrinsèque permet d'augmenter la quantité de thrombine générée initialement par la voie extrinsèque. Les modèles plus récents postulent que la cascade se déroule séquentiellement [99]. Ils séparent typiquement la coagulation en 4 phases : l'initialisation, l'amplification, la propagation et la stabilisation.

1. L'initialisation commence par l'exposition du TF après dommage des vaisseaux. Le TF est le principal initiateur de la coagulation *in vivo*. Il se lie au facteur VIIa et active le facteur IX et le facteur X. L'activation du facteur IX par le complexe TF-VIIa constitue un pont entre les voies intrinsèques et extrinsèques traditionnelles. Le facteur IX forme un complexe à la surface des plaquettes avec le TF et le facteur VIII en présence de Ca^{2+}. Ce complexe permet également l'activation du facteur X. Le facteur Xa se lie alors au facteur II (prothrombine) pour former le facteur IIa (thrombine). Seule une faible quantité de thrombine, peu robuste, est générée par cette réaction. Elle ne permet donc pas encore la formation du réseau de fibrine.
2. La phase d'amplification se déroule principalement à la surface des plaquettes. La thrombine générée durant la phase d'initiation se lie avec les plaquettes et permet leur activation ainsi que l'activation des facteurs VIII et V, cofacteurs du complexe prothrombinase. La thrombine accélère également l'activation de la prothrombine par le facteur Xa et du facteur X par le facteur IXa. Les plaquettes activées exposent la phosphatidylserine (PS, stimule l'assemblage de la prothrombinase et la formation de thrombine) et des sites de liaisons pour enzymes et proenzymes, incluants les facteurs IXa, VIIIa, X, Xa, Va et II (thrombine). L'activation du facteur VIII permet la formation, à la surface des plaquettes activées, du complexe VIIIa-IXa (complexe tenase) qui active le facteur X.
3. Les complexes enzymatiques (tenases et prothrombinases) sont accumulés à la surface des plaquettes et permettent de générer de larges quantités de thrombine ainsi que d'activer davantage de plaquettes. Ceci permet une génération de thrombine en continu

qui dégrade le fibrinogène et génère de la fibrine. Les monomères de fibrine sont instables et s'associent pour former des polymères. C'est la phase de propagation.

4. Durant la phase de stabilisation, la thrombine mène à l'activation du facteur XIII (facteur stabilisateur de fibrine) qui va permettre la formation de liaisons covalentes qui réticulent le polymère de fibrine, assurant force et stabilité au réseau de fibrine et au caillot sanguin. La thrombine entraîne également la génération de plasmine qui va ultimement mener à la dégradation du caillot, permettant un apport sanguin aux nouvelles cellules qui se développent au site de la blessure.

La description des deux représentations de la coagulation a été simplifiée ci-dessus par souci de clarté. Les représentations actuelles de la cascade de coagulation contiennent davantage d'acteurs et de boucles de rétroaction positives ou négatives (inhibition). Un schéma montrant un modèle plus complet des acteurs et de leurs interactions, basé sur les articles de Heemskerk *et al.* [99], Wolberg *et al.* [103] et Palta *et al.* [104] est présenté à l'annexe A.

2.6.2 Solidification d'implants CS-Sang

Augmenter la vitesse de coagulation du sang peut se faire par l'ajout de facteurs de coagulation. Le LBC a étudié les mécanismes sous-jacents à la coagulation des implants BST-CarGel (hybride chitosane/sang sous forme liquide) et a démontré que leur solidification est également dépendante de la génération de thrombine, de l'activation des plaquettes et de la polymérisation de la fibrine (c.-à-d. du facteur XIII) [105]. Le sang complet et l'implant chitosane/sang ont démontré la même séquence de coagulation *in vitro*, commençant par la génération de thrombine après 15 minutes, suivie par une rapide augmentation de l'activation des plaquettes. Après coagulation, un réseau contenant de la fibrine et du chitosane stabilise le caillot qui résiste à la lyse et est physiquement plus stable que les caillots ne contenant que la fibrine [105].

Le LBC a également démontré dans le cas de BST-CarGel que la thrombine, le TF, le facteur VIIa recombinant humain (rhFVIIa) et une combinaison entre TF et rhFVII permettent d'accélérer la solidification de l'implant *in vitro* [105]. Ces résultats ont été également démontrés *in vivo* (sur des trochlées de lapin) pour la thrombine et une combinaison de rhFVIIa + TF. Appliqués sur la surface du cartilage peu avant l'application de l'implant BST-CarGel, ils permettent sa solidification plus rapide [105]. BST-CarGel sans facteurs de coagulation se solidifie *in situ* en 5 minutes. Le glycérol-phosphate contenu dans l'implant BST-CarGel permet une activation des plaquettes, mais celle-ci est trop faible pour accélérer la génération de thrombine. L'ajout de rhFVIIa + TF sur le site de la blessure 60 secondes avant placement de l'implant diminue le temps de solidification à 1.5 minute tandis que l'ajout de

thrombine 10 secondes avant placement de l'implant diminue le temps de solidification à 2 minutes. Lorsque la thrombine est mélangée au chitosane avant l'ajout du sang, la formulation thrombine-polymère-sang se solidifie trop rapidement dans la fiole de mélange pour pouvoir en être extraite facilement. C'est pour cette raison que les facteurs de coagulations sont appliqués au site de la blessure avant le biomatériau.

Le LBC a ensuite réalisé une étude *in vivo* analysant les effets sur le long terme (6,5 mois) d'une réparation du cartilage avec le traitement standard (microfracture) auquel a été ajouté l'implant de BST-CarGel chez le lapin [106]. Durant cette étude, la thrombine a été utilisée pour diminuer le temps de solidification de l'implant. Cette étude a démontré que les implants de chitosane solidifiés avec la thrombine menaient à un cartilage de meilleure qualité que le standard. L'utilisation de thrombine n'altère donc pas les propriétés de l'implant BST-CarGel.

Le choix du LBC d'utiliser la thrombine, le TF et le facteur VIIa a été dicté par leur habilité connue par la littérature à promouvoir le processus de coagulation ainsi que par le fait que ces facteurs de coagulation sont actuellement utilisés dans plusieurs contextes cliniques. Cela permettrait de faciliter leur utilisation dans le domaine orthopédique [105].

D'autres facteurs de coagulation pourraient permettre d'accélérer la cascade de coagulation, mais leur usage dans la littérature est peu fréquent. La raison en est probablement que la relation entre eux est complexe (relation facteur-cofacteur, boucle de rétroaction) et les actions engendrées par l'ajout d'un facteur sont difficilement prévisibles. Par exemple, le facteur Xa permet la génération de thrombine avec son cofacteur, le facteur Va. Le facteur V est activé par le complexe TF+VIIa. Ajouter le facteur Xa n'aura donc peut-être pas une grande influence sur la cascade de coagulation si le nombre de complexes TF+VIIa (et donc Va) est faible. De plus, le facteur Xa est inhibé s'il quitte la surface cellulaire, il ne peut donc probablement pas être ajouté directement.

2.6.3 Thrombine et autres facteurs de coagulation envisagés

Thrombine

Le choix de la thrombine se justifie car il s'agit du dernier facteur de la cascade de coagulation. C'est elle qui permet de cliver le fibrinogène en fibrine. Les boucles de rétroaction de la cascade de coagulation ont pour but d'amplifier cette concentration en thrombine. Il parait donc raisonnable qu'ajouter directement une importante quantité de thrombine permette d'accélérer la solidification du caillot sanguin.

La thrombine est vue par la littérature comme le facteur le plus important pour l'activation

des plaquettes [107]. C'est elle qui déclenche le changement de forme des plaquettes, mais elle induit aussi la sécrétion de nombreux activateurs plaquettaires.

De plus, la thrombine stimule l'angiogenèse et promeut la migration et la prolifération de nombreux types cellulaires impliqués dans la réparation tissulaire [105]. En particulier, la thrombine induit la migration de cellules inflammatoires et peut activer, en plus des plaquettes, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, et les cellules endothéliales [107], les faisant entrer dans un état pro-inflammatoire et procoagulant.

Les applications thérapeutiques les plus étudiées actuellement pour la thrombine semblent être : l'hémostase, le traitement des brûlures et la gestion des plaies, la thérapie des pseudo-anévrismes, l'infarctus vasculaire tumoral et les thérapies contre le cancer [107].

In vitro la concentration de thrombine a une grande influence sur la structure du caillot de fibrine. Une faible concentration de thrombine (<1 nM, <0.1 U/mL) mène à un caillot composé de fibres de fibrine épaisses, mais hautement sensibles à la fibrinolyse tandis qu'une plus haute concentration de thrombine mène à un caillot composé de fines fibres qui résistent mieux à la fibrinolyse, comme présenté à la Figure 2.14 [99]. *In vivo*, la concentration de thrombine est changeante et le réseau de fibrine du caillot est hétérogène [99]. L'ajout d'une grande quantité de thrombine *in vivo* pourrait donc mener à un réseau plus homogène et plus résistant à la fibrinolyse, augmentant la durée de résidence de l'implant.

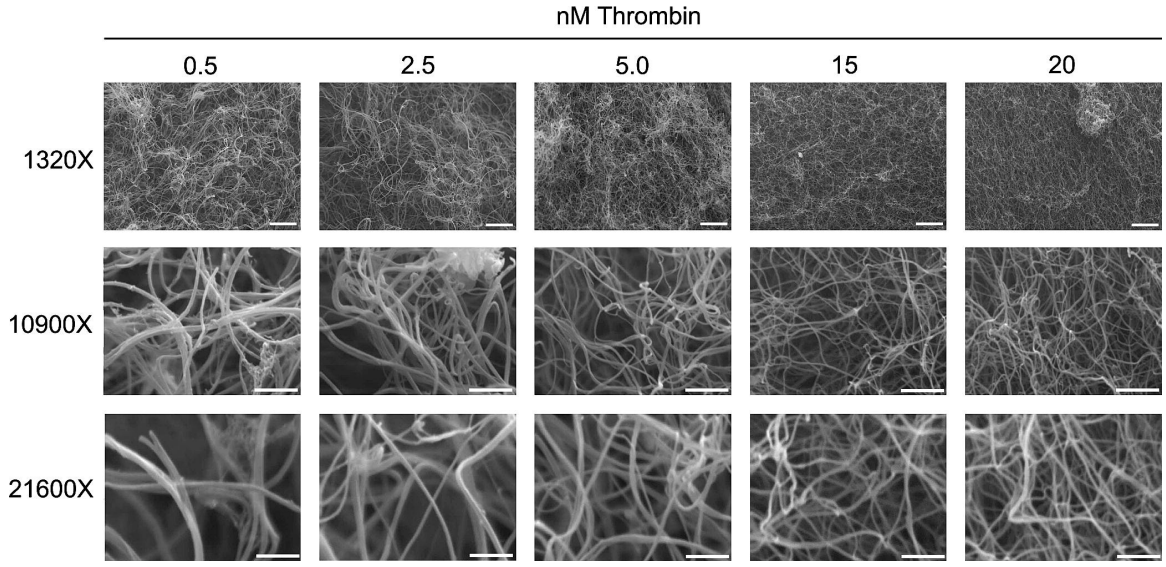


FIGURE 2.14 Images prises avec un microscope électronique à balayage montrant des caillots formés par de la thrombine mélangée à 2mg/mL de fibrinogène. La concentration en thrombine influence la structure du caillot et le diamètre des fibres de fibrinogène. Les barres d'échelles mesurent 10 μm (haut), 2 μm (milieu) et 1 μm (bas). Reproduit de A. S. Wolberg, "Thrombin generation and fibrin clot structure," *Blood Reviews*, vol. 21, no. 3, p. 131–142, 2007, avec la permission de Elsevier [103].

Facteur VIIa et TF

Le choix de TF et du facteur VIIa se justifie car ce sont eux qui déclenchent la cascade de coagulation et la génération de la thrombine. En ajouter en grande quantité dans le sang permet donc d'amplifier et d'accélérer la cascade de coagulation.

En plus de son rôle de déclencheur de la cascade de coagulation, le TF a un rôle de régulateur de plusieurs voies de signalisation cellulaire et de l'expression de gènes [108].

Une fois activé, le TF active les macrophages et induit donc un état pro-inflammatoire [109, 110]. Il semblerait que le TF ait également un rôle dans l'angiogenèse [111] et dans la réparation osseuse [112].

Facteur XIII

Pour augmenter la stabilité du caillot, le facteur XIIIa pourrait être ajouté. Un caillot stabilisé par le facteur XIIIa peut être étiré jusqu'à trois fois sa longueur initiale avant de casser. Ce facteur augmente le module élastique de la fibrine de plusieurs ordres de grandeur [113]. Cependant, c'est la thrombine qui active le facteur XIII. Il se peut donc que l'ajout de throm-

bine implique déjà une augmentation de la concentration en facteur XIII. Une étude menée par le LBC (CHIT-022, résultats non publiés) a d'ailleurs montré que les caillots de PRP obtenus après ajout de thrombine avaient de meilleures propriétés mécaniques (qualitatives) que les caillots de PRP obtenus sans ajout de thrombine. Ce résultat pourrait être expliqué par une augmentation du facteur XIII liée à l'ajout de thrombine.

2.7 Importance et quantification de l'homogénéité des implants CS-PRP

2.7.1 Importance de l'homogénéité des implants hybrides

Tel qu'expliqué à la section 2.4.3, il a été précédemment démontré que la dispersion du CS dans les caillots hybrides CS-PRP dépend fortement de la Mn du CS. Cette dispersion n'est pas homogène si la Mn est élevée (>79kDa) ou basse (<11KDa).

Il est raisonnable de penser que l'homogénéité de cette dispersion dépend également de la composition du biomatériau. Cette composition étant amenée à changer dans le cadre de cette thèse, il était important de développer une méthode permettant de quantifier l'homogénéité des caillots hybrides de façon à pouvoir utiliser ce paramètre pour comparer différentes formulations entre-elles. Deux exemples de coupes histologiques issues d'un caillot hybride sont donnés aux Figures 2.15 (zoom 10x) et 2.16 (zoom 80x). On y voit que le CS est réparti de façon homogène parmi les composés sanguins.

Il est attendu que l'homogénéité des caillots affecte ses propriétés mécaniques et sa dégradation ainsi que la réponse tissulaire [19]. Il s'agit donc d'un paramètre critique.

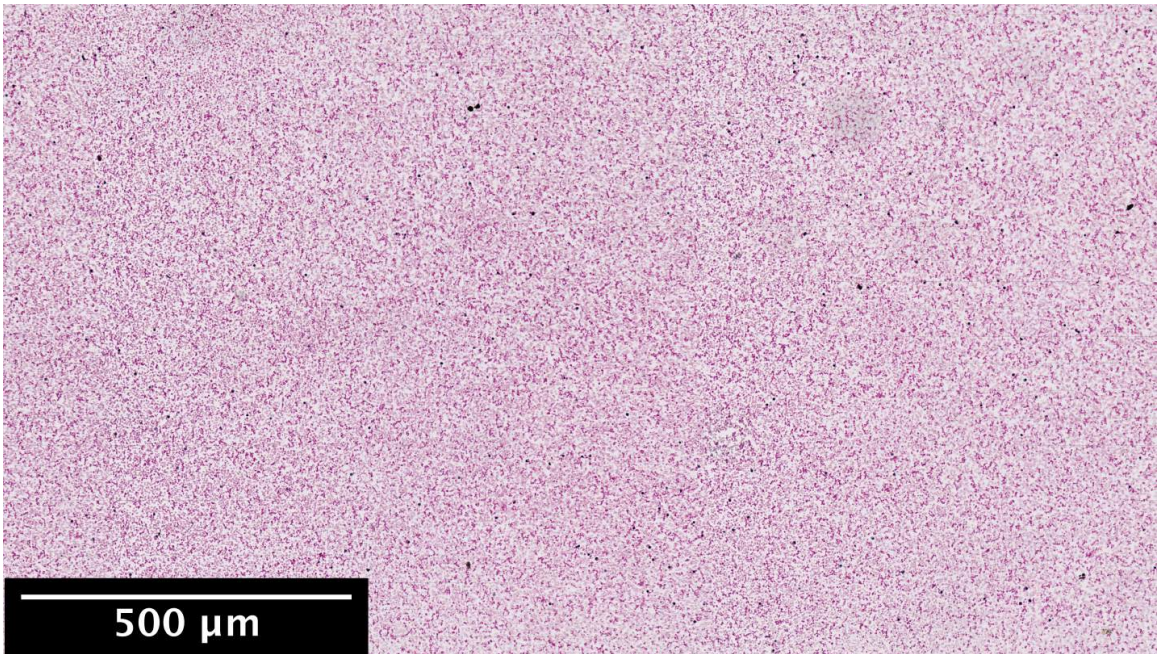


FIGURE 2.15 Les échantillons histologiques sont découpés et colorés avec du rouge cibacron (pour le CS) et de l'éosine (pour les érythrocytes). En rose foncé se trouve le CS, en rose clair les érythrocytes et en blanc le fond. Les points noirs sont des leucocytes. Image prise à 10X.

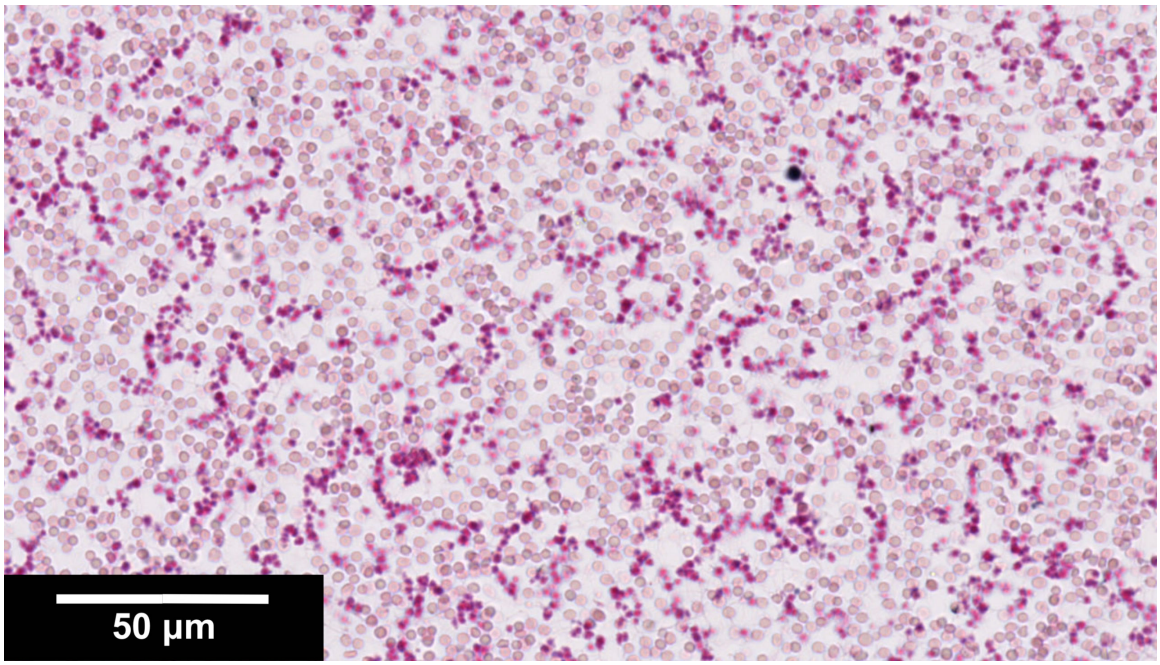


FIGURE 2.16 Même coupe qu'à la figure 2.15. Image prise à 80X.

2.7.2 Méthodes existantes pour la quantification de l'homogénéité

Avant de construire notre propre algorithme, plusieurs classes d'algorithmes ont été explorées, telles que :

1. L'*analyse de texture*, qui étudie la variation spatiale des intensités des pixels [114].
2. L'*analyse structurelle*, qui étudie les caractéristiques des objets identifiés dans une image et les relations qui les lient [115].
3. L'*analyse statistique de processus ponctuels*, qui considère les objets comme des points et étudie la manière dont ces points sont répartis dans l'image de façon statistique [116].

Parmi ces classes, l'analyse statistique de processus ponctuels a particulièrement influencé la construction de notre algorithme et est détaillée ici-bas. Cette description est basée sur le livre "*Spatial point patterns : methodology and applications with R*" écrit par A. Baddeley, E. Rubak et R. Turner.

Un tableau reprenant 13 algorithmes décrits dans la littérature pour la quantification de l'homogénéité est donné à l'annexe D.

Il est important de noter que tous les algorithmes ne se basent pas sur une définition unique de la notion d'homogénéité. Il est en réalité assez peu fréquent que cette notion soit rigoureusement définie. Il incombe alors au lecteur de comprendre ce que l'auteur entend par "*homogénéité*" et de déterminer si ce concept s'applique à sa situation à lui. L'une des étapes majeures de la construction de notre algorithme de quantification a dès lors été d'établir une définition de l'"*homogénéité*" adaptée à notre problématique.

Analyse statistique de processus ponctuels [3]

Un processus ponctuel est un ensemble de points qui donne la localisation spatiale d'objets, de choses ou d'événements. Il peut, par exemple, faire référence à la prévalence d'une maladie dans une population donnée, à l'emplacement d'une espèce d'arbres dans une forêt, à l'emplacement d'accidents d'avion ou de la route, à l'emplacement des hôpitaux dans un pays, etc. Dans un processus ponctuel, c'est la façon dont les points sont répartis qui est étudiée. L'un des principaux objectifs de l'analyse est d'identifier des tendances particulières dans un ensemble de données prédéfini. De nombreux domaines s'intéressent à l'analyse des processus ponctuels. Le développement des méthodes d'analyse dans ce domaine est donc en plein essor [116].

3. Section basée sur le livre "Spatial point patterns : methodology and applications with R" écrit par Baddeley *et al.* [116]

Pour un processus ponctuel donné, l'analyse effectuée peut chercher à répondre à diverses questions [116] :

— Les points d'un ensemble de données sont-ils répartis de manière homogène ?
— Peut-on identifier des regroupements ?
— S'il n'y a pas homogénéité, la densité des points est-elle liée à une variable donnée (c'est-à-dire une variable explicative) ?
— Le modèle de points soutient-il une hypothèse scientifique ?

Ici, l'objectif de notre analyse est l'intensité, c'est-à-dire le nombre de points par unité de surface. Nous voulons déterminer si elle est constante ou varie spatialement (c'est-à-dire si elle est homogène ou non). L'intensité est une quantité liée à l'espérance du nombre de points.

Pour évaluer ou valider l'homogénéité d'un modèle de points, il faut d'abord comprendre ce que l'on entend par intensité homogène. Baddeley *et al.* 2015 donnent une définition satisfaisante, qui sera utilisée pour la suite de cette section :

> "Un modèle de points unique ne peut pas être parfaitement homogène, car un point ne peut pas être réparti uniformément sur le plan comme du beurre. La seule façon de donner un sens rigoureux à l'hypothèse d'homogénéité est de penser statistiquement. [...] C'est la moyenne de tous les résultats possibles qui est homogène." [116]

Cela est illustré à la figure 2.17.

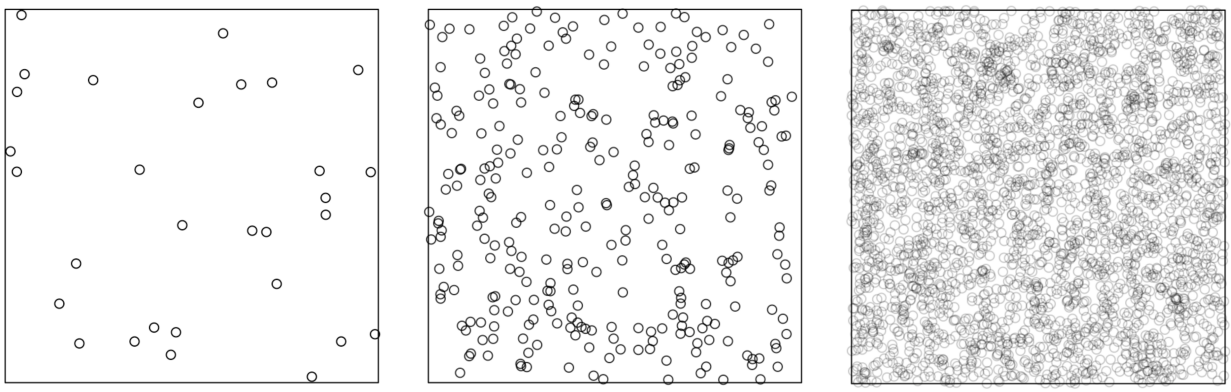


FIGURE 2.17 Modèles de points simulés avec une intensité homogène. Gauche : 30 points par unité de surface. Milieu : 300 points par unité de surface. Droite : 3000 points par unité de surface.

Soit X un processus ponctuel et B une sous-région de l'espace 2D dans lequel se situe X. Selon la définition ci-dessus, nous pouvons évaluer que X est homogène si le nombre attendu

de points de X inclus dans son sous-ensemble B est proportionnel à l'aire $|B|$ de B :

$$E[n(X \cap B)] = \lambda |B|,$$

où λ est une constante appelée l'intensité, et $n(X \cap B)$ est le nombre de points de X inclus dans B.

Une distinction est faite entre l'*intensité* d'un processus ponctuel et sa *densité*. Un motif de points peut être vu comme l'expression d'un processus ponctuel sous-jacent ayant une intensité λ. Cet intensité peut être estimée à partir de la densité observée du motif en question. Cette densité est souvent notée $\hat{\lambda}$, le chapeau indiquant qu'il s'agit d'une estimation.

Tout comme la moyenne d'un ensemble de données échantillonnées est un estimateur non biaisé de la véritable moyenne, $\hat{\lambda}$ est un estimateur non biaisé de la réelle intensité λ, si nous supposons que la densité est homogène. Une mesure de base de la densité $\hat{\lambda}$ est le nombre de points de l'ensemble de données observées divisé par son aire :

$$\hat{\lambda} = \frac{n(x)}{|W|}$$

où x est l'ensemble des points des données observées dans une fenêtre W, $n(x)$ le nombre de points de x et $|W|$ l'aire de W.

Une question courante concernant les processus ponctuels est de savoir si leur intensité est homogène. Pour répondre à cette question, la densité d'un motif de points peut être mesurée à différents emplacements au sein de la zone d'étude. Cette approche permet d'évaluer si la densité est constante dans toute la zone d'étude. Plusieurs techniques non-paramétriques sont disponibles pour mesurer la densité locale. La méthode la plus intuitive est probablement de compter si des régions de même superficie contiennent un nombre similaire de points. C'est l'idée derrière le comptage de quadrats.

La fenêtre d'observation W est divisée en m sous-régions $(B_1, \ldots, B_m)$ appelées quadrats. Pour simplifier, supposons que ces régions ont la même superficie. Le nombre de points dans chaque quadrat est dénombré ($n_j = n(x \cap B_j)$ pour $j = 1, \ldots, m$). Ces dénombrements sont des estimateurs non biaisés des valeurs attendues $E[(x \cap B_j)]$. Ils sont donc censés être égaux "en moyenne" si l'intensité est homogène. Au contraire, si une tendance spatiale est observée dans les dénombrements, cela suggère que l'intensité est inhomogène.

Comme on peut le déduire de l'explication précédente, un paramètre critique de cet algorithme est la taille des quadrats. Un compromis doit être fait ici entre le biais et la variabilité. Choisir des quadrats plus grands réduira l'erreur relative des dénombrements n_j (erreur stan-

dard divisée par la moyenne) mais ne permettra pas de détecter des changements subtils de la densité spatiale. Choisir des quadrats trop petits mène au contraire au risque d'obtenir des quadrats contenant trop peu de points, voire aucun point, situation excluant la possibilité de construire une statistique de test significative (voir ci-après).

Pour évaluer l'homogénéité, on peut effectuer un test statistique dont l'hypothèse nulle H_0 est que l'intensité est homogène. L'hypothèse alternative est donc que l'intensité est inhomogène, mais d'une façon non spécifiée.

Si la distribution des points de W est aléatoire, alors elle peut être modélisée par une loi de Poisson. En effet, la loi de Poisson s'applique lorsque les événements (points dans notre cas) sont indépendants, qu'il y a un grand nombre d'événements, et que la probabilité qu'un événement individuel se produise est faible et uniforme (par exemple, qu'un point se trouve à un endroit donné). La loi de Poisson est dérivée comme une approximation de la loi binomiale.

Si nous supposons que le processus ponctuel suit une loi de Poisson, l'hypothèse nulle H_0 est le caractère aléatoire spatial complet (CSR - "complete spatial randomness") et l'hypothèse alternative H_1 est un processus de Poisson inhomogène.

Considérons que W est divisée en m quadrats $(B_1, \ldots, B_m)$ contenant chacun un nombre de points $n_1, \ldots, n_m$. Si H_0 est vérifiée, les n_j sont les réalisations de variables aléatoires de Poisson indépendantes, avec des valeurs attendues $\mu_j = \lambda a_j$, où λ est l'intensité inconnue, et a_j est la superficie de B_j. Si les quadrats ont tous la même superficie, alors les n_j sont les réalisations de variables aléatoires de Poisson indépendantes, avec une moyenne égale λa.

L'ensemble des m fréquences observées peut ensuite être comparé à l'ensemble des valeurs attendues à l'aide d'un test du Chi-carré. Le test χ^2 du Chi-carré admet deux approches différentes : (1) tester l'adéquation à la loi de Poisson en supposant l'homogénéité , (2) tester l'homogénéité en supposant l'indépendance. Comme nous analysons ici l'homogénéité, nous choisissons la deuxième approche.

Le nombre total de points est donné par $n = \sum_j n_j$ et la superficie totale de la fenêtre par $a = \sum_j a_j$. La densité est donc donnée par $\bar{\lambda} = n/a$ et le dénombrement attendu dans le j-ème quadrat par $e_j = \bar{\lambda} a_j = n a_j / a$. La statistique de test est donnée par :

$$X^2 = \sum_{j=1}^{m} \frac{(observé - attendu)^2}{attendu} = \sum_{j=1}^{m} \frac{(n_j - e_j)^2}{e_j} = \sum_{j=1}^{m} \frac{(n_j - \bar{\lambda} a_j)^2}{\bar{\lambda} a_j}.$$

Dans le cas où les quadrats ont tous la même superficie, les n_j sont indépendants et ont la

même valeur attendue sous l'hypothèse nulle. La statistique de test se simplifie donc en :

$$X^2 = \sum_{j=1}^{m} \frac{(n_j - n/m)^2}{n/m}.$$

Sous l'hypothèse nulle H_0, la statistique de test X^2 suit approximativement une distribution χ^2 ayant $m-1$ degrés de liberté : $X^2 \sim \chi^2_{(m-1)}$. Cette approximation est généralement considérée comme acceptable lorsque les dénombrements observés (a_j) et attendus (e_j) sont supérieurs à 5 pour tous les quadrats. L'hypothèse nulle est généralement rejetée pour une p-valeur inférieure ou égale à 0.05. Plus l'observation et la théorie diffère, plus la valeur de X^2 est grande et plus la p-valeur est faible.

D'autres méthodes peuvent servir à évaluer la signification statistique, notamment les simulations de Monte-Carlo. Bien que le test χ^2 soit simple à utiliser, il n'est pas toujours le plus pertinent pour l'analyse des quadrats [116]. On pourrait envisager le test du rapport de vraisemblance ou les divergences de Cressie-Read. De plus, des tests plus performants pourraient être appliqués si une covariable influençant l'intensité des événements était connue, ce qui ne semble pas être le cas pour les implants CS-PRP.

Le comptage par quadrats est une méthode simple mais qui reste performante. Toutefois, sa principale faiblesse réside dans le manque de précision des informations qu'elle fournit. L'hypothèse alternative à H_0 se limite à affirmer que le processus n'est pas un processus de Poisson homogène, sans en préciser la cause. Cela peut découler d'une intensité non uniforme ou d'un manque d'indépendance entre les points. Le défi est donc que de nombreuses formes de déviation par rapport à H_0 sont possibles.

Une autre limite de cet algorithme réside dans la difficulté à déterminer la taille appropriée des quadrats. Il s'agit implicitement d'un choix sur l'échelle spatiale. Pour contourner cet obstacle, la littérature recommande de calculer la statistique du χ^2 pour différentes tailles de quadrats. On peut ensuite représenter graphiquement l'évolution de la p-valeur de cette statistique en fonction de la taille choisie des quadrats. Cela permet d'avoir une idée de l'évolution de la p-valeur et d'effectuer un choix de taille de quadrat plus éclairé. Cette idée de faire varier le taille des quadrats sous-tend l'algorithme que nous avons développé.

Les objets physiques, trop grands pour être traités comme des points idéaux à l'échelle d'intérêt, peuvent néanmoins être pris en compte en enregistrant l'emplacement du centre de l'objet comme un point, et en traitant la taille et la forme de l'objet comme des attributs. Ainsi, nous pourrions définir la molécule de CS ou les érythrocytes par leur centre de masse et leur attribuer leur superficie comme attribut. Nous pourrions alors effectuer un test de comptage de quadrats. Bien sûr, lorsque plusieurs répliques d'un modèle de points sont dis-

ponibles, la puissance et la portée des techniques statistiques augmentent considérablement. Nous pourrions donc utiliser plusieurs images de l'échantillon histologique à l'étude (de la même tranche ou de différentes tranches provenant du même échantillon).

2.8 Modèle animal [4]

2.8.1 Choix du modèle animal

Les modèles animaux sont utilisés pour démontrer l'efficacité et la sécurité de dispositifs médicaux avant les tests cliniques. Le modèle choisi doit donc refléter l'application prévue du dispositif développé.

Pour la réparation de la coiffe des rotateurs, les modèles de rongeurs et de lapins sont recommandés pour les preuves de principe et la toxicologie dès les premières étapes de la conception d'un dispositif médical. Les animaux plus gros, tels que la brebis, le chien ou plus rarement les primates non humains, sont utilisés comme modèles dans les études pivots (c.-à-d. études indépendantes réalisées selon les bonnes pratiques de laboratoire, souvent nécessaires avant les essais cliniques).

Pour comprendre les voies cellulaires et moléculaires ainsi que pour développer de nouveaux traitements pour les pathologies de la coiffe des rotateurs, le choix du modèle animal utilisé est important. En accord avec ce qui est observé chez l'humain, un modèle animal pour la réparation de la coiffe des rotateurs ne devrait pas présenter de régénération spontanée du tendon après blessure [28]. La taille du tendon devrait idéalement permettre l'utilisation de techniques de réparation similaires à celles utilisées chez l'humain. De plus, pour reproduire au mieux la pathologie chez l'humain, une atrophie irréversible, de la rigidité et une accumulation graisseuse devraient idéalement être présentes dans le muscle après lésion [117]. Évidemment, chaque modèle animal présente des avantages et des inconvénients et aucune déchirure de la coiffe des rotateurs ne sera identique chez l'Homme et chez l'animal. De plus, il est à noter que chez l'Homme, les tendons individuels de la coiffe des rotateurs se confondent en un site d'insertion unique au niveau de la tête humérale. Le lapin, le rat, le chien et la brebis ne présentent pas cette caractéristique anatomique [118]. Ces quatre modèles sont pourtant les plus utilisés dans la littérature pour les études sur la coiffe des rotateurs et sont ci-après discutés.

4. Section basée sur l'article "Rotator cuff repair : a review of surgical techniques, animal models, and new technologies under development" écrit par Deprés-Tremblay *et al.* [28]

Le rat

Le rat possède un acromion en forme d'arche, rendant son anatomie similaire à celle de l'humain [119]. Chez l'Homme, cette arche est formée par l'acromion, le coracoïde et le ligament coraco-acromial. Chez le rat, l'arche est formée du coracoïde, de la clavicule, de l'acromion et du ligament qui les lie [120]. Une différence majeure entre l'Homme et le rat est que chez le rat, la partie du muscle supra-épineux qui passe sous l'arche est musculaire et non tendineuse comme chez l'humain [28].

Une autre similitude entre le rat et l'humain est la capacité à élever leurs membres supérieurs au-dessus de leur tête et le fait que tous deux souffrent d'une diminution d'amplitude de mouvement après une déchirure de la coiffe des rotateurs [119]. De plus, la déchirure de la coiffe des rotateurs chez le rat mène, comme chez l'humain, à une dégénération du cartilage de la tête humérale et de la cavité glénoïde [121]. Ces similitudes font que le rat est souvent présenté dans la littérature comme l'animal le plus approprié pour l'étude de la coiffe des rotateurs [119,120]. C'est le modèle le plus utilisé pour l'étude de la coiffe des rotateurs [122] et une littérature importante est disponible à ce sujet.

Cependant, l'utilisation du rat comme modèle présente plusieurs différences non négligeables avec l'humain : 1) le muscle sous-épineux prend moins de place sous l'arche acromiale [123], 2) le rat ne présente pas d'accumulation graisseuse irréversible après déchirure, 3) il ne présente pas non plus un taux d'échec de la réparation aussi élevé que l'humain ce qui diminue son utilité pour évaluer les techniques de réparation [123]. Certaines études considèrent que le tendon sous-épineux du rat serait un meilleur modèle que le SST pour représenter le SST chez l'humain (p. ex. Liu *et al.* [123]). Ceci est dû au fait que le sous-épineux présente plus d'accumulation graisseuse, une atrophie musculaire plus importante et une plus grande rétraction musculaire [123].

Malgré les limitations présentées, la similitude anatomique et la similitude d'amplitude de mouvements font du rat un animal approprié et bon marché pour une première évaluation de la sécurité, de l'efficacité et des mécanismes de réparation d'un traitement [28]. Cependant, effectuer une chirurgie de réparation de la coiffe des rotateurs chez le rat est un défi au vu de sa petite taille [28].

Le rat est le premier modèle animal à avoir été considéré pour cette thèse. Cependant, de premiers tests avec du sang de rat commercial nous ont permis de réaliser que cet animal coagule très rapidement (<60 secondes). Ce phénomène, combiné à l'ajout de thrombine accélérant davantage la coagulation, rend le biomatériau impossible à manipuler et implanter. Nous avons donc dû nous tourner vers un autre modèle.

Le lapin

Le lapin est surtout utilisé dans la littérature pour l'étude des changements musculaires, de la formation de l'enthèse et de l'expression des facteurs de croissance associés aux déchirures de la coiffe des rotateurs [120, 122]. Il s'agit également d'un modèle adapté pour l'étude des performances biomécaniques [124].

Les avantages de ce modèle sont qu'il présente une atrophie musculaire et une accumulation graisseuse, comme l'humain. Comparé au rat, la taille de l'animal et de sa RC facilite également la chirurgie. Cependant, plusieurs différences majeures existent avec la RC humaine : l'articulation de l'épaule est une articulation portante chez le lapin. De plus, contrairement à l'Homme, le lapin ne réalise pas ou peu de mouvements du membre antérieur au-dessus de sa tête.

Pour modéliser le SST humain chez le lapin, plusieurs tendons peuvent être utilisés. Même si le SST est le tendon le plus utilisé dans la littérature, il n'est pas le seul. L'infra-épineux a également été utilisé et des études plus récentes proposent même l'utilisation du supra-scapulaire car son tendon passe sous une arche fermée [120], imitant l'acromion humain. De plus, après détachement du tendon, le supra-scapulaire présente une infiltration graisseuse similaire à celle observée chez l'humain [125].

Les modèles de rupture de la coiffe des rotateurs chez le lapin décrits dans la littérature utilisent principalement le tendon SST [122]. Ce modèle a également été utilisé par le LBC dans le passé. Notre laboratoire possède donc une expertise non négligeable du lapin en tant que modèle animal et du modèle de déchirure puis réparation de la coiffe des rotateurs en particulier.

La taille du lapin, supérieure à celle du rat, facilite également de nombreuses techniques chirurgicales [126]. De plus, la précision et la reproductibilité des blessures et des réparations augmentent avec la taille de l'animal [117].

Le principal désavantage du lapin comme modèle est la différence d'amplitude de mouvement qu'il présente avec l'humain (pas ou peu d'activité des membres supérieurs au-dessus de la tête) [28].

De premiers tests avec du sang de lapin commercial nous ont permis de valider que la coagulation du biomatériau se faisait suffisamment lentement que pour permettre sa manipulation et son implantation.

La brebis, le chien et les primates non humains

Chez la brebis, le sous-épineux présente une taille similaire au supra-épineux humain [28]. Cette similitude en fait un modèle intéressant pour étudier différentes techniques de réparation de la coiffe des rotateurs [120], puisqu'on peut réaliser chez la brebis des chirurgies similaires à celles de l'humain. De plus, la brebis est un animal dont il est facile de s'occuper, qui est facile à manipuler, peu cher, et accepté par la communauté scientifique en tant que modèle animal [120]. Cependant, contrairement au rat, l'anatomie de la coiffe des rotateurs de la brebis n'est pas comparable à celle de l'Homme [120].

Le chien présente un chargement de la coiffe des rotateurs similaire à celui de l'humain et est un bon modèle pour les pathologies chroniques [28]. De plus, il est docile et peut suivre divers protocoles de réhabilitation postopératoire. Cependant, l'utilisation de cet animal soulève plus de considérations éthiques. Il en va de même pour les primates non humains, qui sont anatomiquement les animaux les plus proches de l'humain.

Résumé

Tenant compte du stade de développement du biomatériau et des avantages et inconvénients présentés, le lapin sera ici choisi comme modèle animal.

Un résumé détaillant les avantages et les inconvénients des différents modèles, issus de Deprés-Tremblay *et al.* [28] (traduit et légèrement modifié) est présenté au Tableau 2.5.

TABLEAU 2.5 Avantages et désavantages de différents modèles animaux pour la réparation de la coiffe des rotateurs. Reproduit et traduit de G. Deprés-Tremblay et al., "Rotator cuff repair : a review of surgical techniques, animal models, and new technologies under development," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 25, no. 12, p. 2078–2085, 2016, avec la permission de Elsevier [28].

Modèle animal	Avantages	Désavantages
Rat	◦ Présence d'une arche acromiale et activités du membre antérieur au dessus de la tête. ◦ Le SST passe sous l'arche ◦ Économique ◦ Élévation similaire du membre antérieur	◦ Formation de tissu cicatriciel et réparation spontanée de la RC sans traitement ◦ Pas de re-déchirures postopératoires ◦ Petite taille ◦ SST court ◦ Infiltration de graisse dans le tendon infra-épineux (ISP) uniquement ◦ Les déchirure de la coiffe des rotateurs (RCT) guérissent mieux que chez l'humain ◦ Moins de couverture du SST ◦ La partie du SST qui passe sous l'arche acromiale est musculaire et non tendineuse
Lapin	◦ Réparation chirurgicale plus grande et plus précise possible ◦ Tunnel osseux scapulaire ◦ Atrophie musculaire et infiltration graisseuse similaires ◦ Propriétés de guérison similaires ◦ Bon modèle pour étudier les RCT et les lésions nerveuses ◦ Le subscapulaire est similaire au SST humain ◦ Utilisé pour les auto-greffes et les greffes dermiques	◦ Articulation portante ◦ Activités du membre antérieur au dessus de la tête minimes ou inexistantes ◦ Le ISP est musculaire et non tendineux ◦ Moins efficace pour retenir les sutures ◦ Plus de proéminence osseuse
Brebis	◦ Réparation chirurgicale plus grande et plus précise possible ◦ Facilité de manipulation et de logement ◦ Un modèle de déchirure chronique a déjà été utilisé ◦ Le ISP est de taille similaire à celle du SST humain ◦ Disponibilité ◦ Bon modèle pour évaluer différentes techniques de réparation ou augmentations biologiques	◦ Articulation portante ◦ Pas d'activité des membres antérieurs au dessus de la tête ◦ Anatomie non comparable à celle de l'humain
Chien	◦ Génère des chargements sur la coiffe des rotateurs similaires à celles des humains ◦ Tolère les plâtres, l'élingage, la course sur tapis roulant et les protocoles de réhabilitation postopératoires ◦ Bon modèle pour les blessures chroniques	◦ Considérations éthiques
Primates non humains	◦ Fonction et anatomie les plus similaires à celles des humains	◦ Coût élevé et complexité de leur logement et de leur traitement ◦ Considérations éthiques

2.8.2 Choix du modèle de lésion

Le modèle de lésion le plus fréquemment décrit dans la littérature chez le lapin est la transsection complète du tendon SST proche de son site d'insertion, suivi par une réparation transosseuse [122].

La transsection du tendon permet de modéliser une blessure aiguë de la coiffe des rotateurs. La blessure aiguë est communément utilisée chez le lapin dans la littérature et peu d'études mettent en place des blessures chroniques. En effet, bien que la blessure chronique soit la plus commune chez l'Homme, il est techniquement plus difficile de l'induire chez le lapin [127].

2.9 Propriétés mécaniques et techniques de tests du tendon supra-épineux

2.9.1 Propriétés mécaniques des tendons : généralités

La fonction première des tendons est mécanique. Il est donc important de déterminer leurs propriétés mécaniques après réparation. Les tendons, tout comme les ligaments, sont destinés à résister à des charges cycliques et à être allongés de façon répétée pendant les mouvements [128].

La structure longitudinale et hiérarchisée du tendon, décrite à la section 2.2.3, lui donne des propriétés mécaniques anisotropes : lorsqu'un tendon est étiré selon son axe longitudinal, ses propriétés mécaniques peuvent être jusqu'à 1000 fois supérieures à celles résultant d'un étirement transverse [129].

En plus de ses propriétés anisotropes, le tendon réagit de façon non linéaire aux chargements longitudinaux. Sa courbe contrainte-déformation présente en effet deux régions distinctes : la région "pied" et la région linéaire, décrites à la section 2.2.3 (Figure 2.4).

La structure du tendon le rend également viscoélastique : il possède à la fois des propriétés élastiques et visqueuses.

Les matériaux visqueux se déforment linéairement avec le temps lorsqu'une contrainte est appliquée. Les matériaux élastiques se déforment instantanément lorsqu'ils sont étirés et reviennent immédiatement à leur état d'origine une fois la contrainte supprimée. Les matériaux viscoélastiques combinent ces deux déformations, comme illustré à la Figure 2.18.

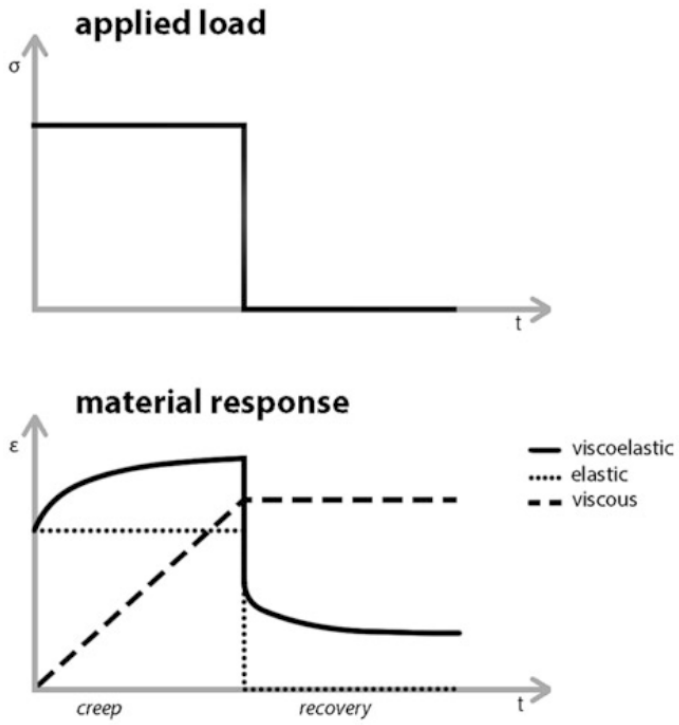


FIGURE 2.18 Contrainte (σ) et déformation (ε) de matériau élastique, visqueux et viscoélastique. Reproduit de M. Conti, V. Danese, and V. Pata, "Aging of viscoelastic materials : A mathematical model," *Mathematical Modeling in Cultural Heritage : MACH2019*, 2021 : Springer, pp. 135-146, avec la permission de Springer Nature [130].

Ces caractéristiques élastiques et visqueuses peuvent être quantifiées par plusieurs propriétés, telles [131] :

— La *rigidité* et le *module de Young* quantifient tous deux la capacité d'un corps élastique à résister à la déformation. La rigidité (N/mm) correspond à la pente de la courbe force-élongation d'un matériau (voir Figure 2.19a). Il s'agit d'une propriété structurelle, c'est-à-dire qu'elle est liée à la forme et la géométrie du matériau qu'elle décrit (p. ex. un même matériau avec une aire transverse deux fois plus grande aura une rigidité plus élevée). Le module de Young (Pa) correspond à la pente de la courbe contrainte-déformation d'un matériau, où la contrainte est la force normalisée par l'aire du matériau et la déformation est l'élongation normalisée par la longueur initiale du matériau (voir Figure 2.19b). Le module de Young est donc indépendant de la forme et de la géométrie du matériau.

— Le *décalage de phase* correspond au délai entre l'application d'une contrainte et la déformation qui en résulte. On le mesure en appliquant une contrainte ou une déformation

cyclique à un matériau. Les matériaux élastiques purs ne présentent pas de décalage de phase (Figure 2.20a). Les matériaux visqueux purs présentent un décalage d'un quart de cycle (90°) entre l'application de la contrainte et la déformation (Figure 2.20b). Les matériaux viscoélastiques présentent un décalage de phase situé entre 0° et 90°.

— L'*hystérèse* représente la quantité d'énergie dissipée par le matériau à cause du frottement interne résultant des cycles de chargement et de déchargement mécaniques. Elle est quantifiée comme l'aire entre les courbes contrainte-déformation liées au chargement et au déchargement lors de conditionnements cycliques (voir Figure 2.21).

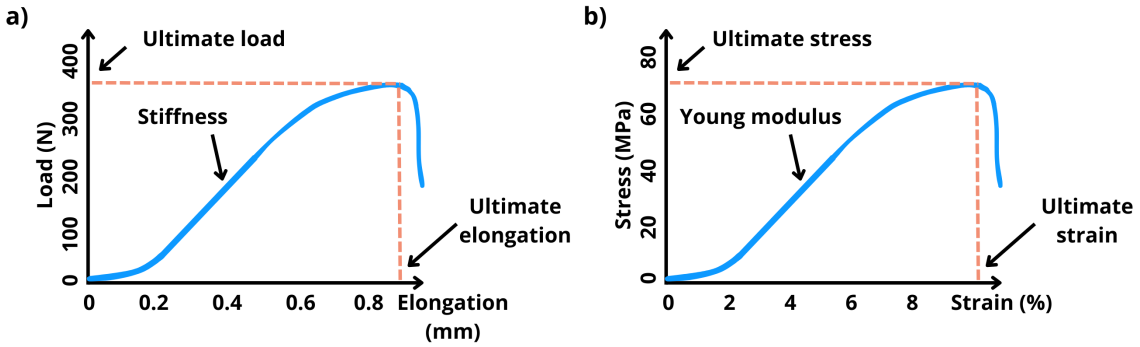


FIGURE 2.19 a) Courbe force-élongation et b) courbe contrainte-déformation. La courbe contrainte-déformation est une normalisation de la courbe force-élongation selon l'aire et la longueur du tendon.

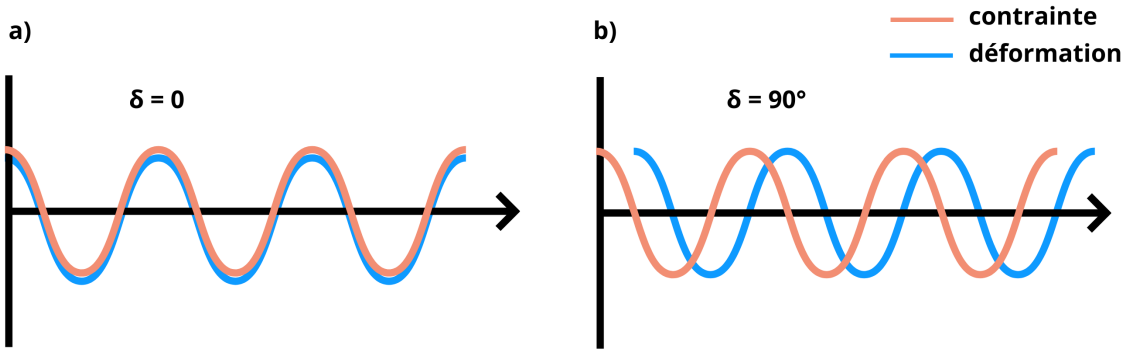


FIGURE 2.20 Courbes contrainte-déformation résultant d'un chargement cyclique a) pour un matériau parfaitement élastique et b) pour un matériau parfaitement visqueux.

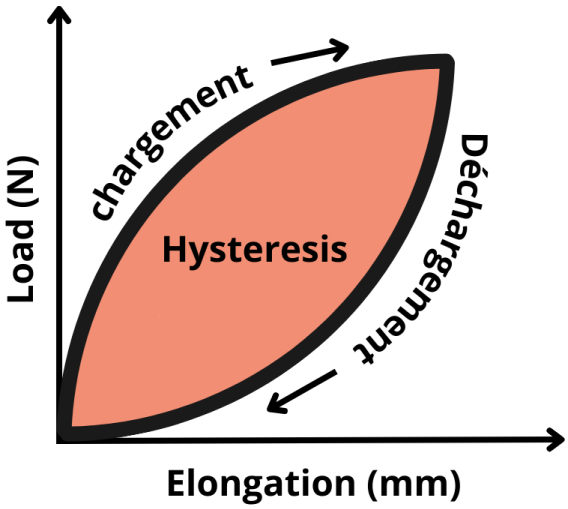


FIGURE 2.21 Chargement et déchargement d'un matériau élastique pur. La zone entre les deux courbes représente l'hystérèse.

2.9.2 Tests dynamiques et tests à la rupture

Avant de réaliser des tests mécaniques sur les tendons, un préconditionnement cyclique est généralement effectué afin de standardiser les mesures. Le préconditionnement a pour but de légèrement étirer le tendon sans l'endommager. Cela permet au tendon d'atteindre un état "stable", en alignant ses fibres de collagène [131].

Après le précondionnement, une variété de tests mécaniques peuvent être effectués : élongation jusqu'à la rupture, tests cycliques dynamiques, tests de fatigue, etc.

Pour caractériser les propriétés mécaniques d'un tendon, le standard utilisé par la littérature est la contrainte de rupture suite à une traction uniaxiale, aussi appelé essai de traction quasi-statique [132]. Lors de cet essai, le tendon est maintenu à ses extrémités par deux pinces. Il est d'abord "préconditionné" par quelques cycles lui appliquant une fraction de la contrainte maximale anticipée (p. ex. 20 cycles à 30% de la force maximale anticipée [133]). Ensuite, les pinces s'éloignent à vitesse constante en appliquant une force croissante sur l'échantillon (une pince maintient l'os, l'autre maintient le muscle). Ceci a pour effet d'étirer le tendon. Au cours du test de traction quasi-statique, une vitesse lente est nécessaire pour éviter l'échauffement local du tissu et assurer un essai reproductible, d'où la dénomination de "quasi-statique". L'allongement et la force appliquée sont enregistrés et convertis en "déformation" et "contrainte". Le test s'arrête à la rupture du tendon, caractérisée par une diminution importante de l'effort généré par l'étirement (p. ex. une décroissance de 30% par rapport à la précédente force maximale [133]). Cet essai permet d'obtenir la courbe contrainte-déformation

d'un tendon (voir Figure 2.4) et de calculer le module de Young (pente de la zone linéaire de la courbe, p. ex. 22,4 ±7,4 MPa pour le supra-épineux chez le rat [134]), l'allongement (changement de longueur/longueur initiale) et la contrainte à la rupture (p. ex. 0,5 ± 0,2 et 9,5 ± 4,5 MPa respectivement pour le supra-épineux chez le rat [134]), la rigidité (p. ex. 6,1 ±1,0 N/mm pour supra-épineux chez le rat [134]) et le coefficient de Poisson du matériau analysé (ν= rétrécissement transverse relatif/allongement longitudinal relatif).

Il n'est pas rare que le test à la rupture soit effectué en série avec des tests dynamiques. En effet, les faibles déformations utilisées dans les essais dynamiques n'altèrent pas l'intégrité du tendon, ce qui permet de combiner ces essais entre eux.

De nombreux paramètres différents définis lors des tests cycliques dynamiques affectent la réponse du tendon en raison de la nature viscoélastique du tissu. Le module dynamique dérivé des essais dynamiques cycliques est défini comme l'amplitude de contrainte divisée par l'amplitude de déformation. Ces amplitudes sont illustrées à la Figure 2.22. Ainsi, la mesure du module dynamique est affectée par les paramètres de test, en fonction des déformations et des fréquences sélectionnées. Ces modules décrivent le comportement des tendons en fonction du taux de chargement et de l'historique de chargement.

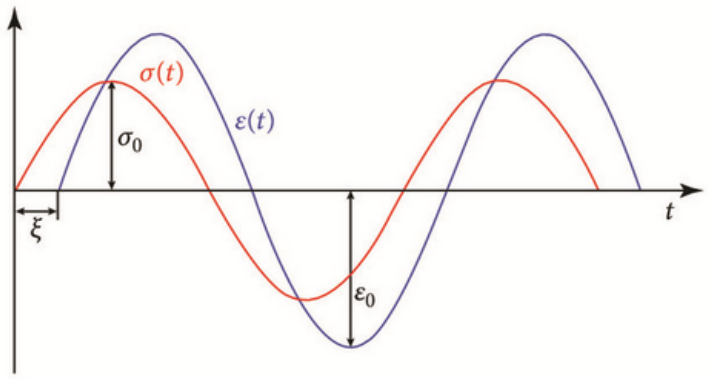


FIGURE 2.22 Déformation suite à une contrainte sinusoïdale d'un matériau visoélastique. Image issue de Chen *et al.* [135].

Le fluage et la relaxation des contraintes peuvent également être utilisés pour caractériser le comportement viscoélastique des tendons. Le fluage est une augmentation de la déformation d'un matériau sous une charge constamment appliquée. Initialement, l'allongement sous une charge constante se produit rapidement, mais cette réponse ralentit avec le temps. Contrairement au fluage, la relaxation des contraintes maintient la déformation constante. La relaxation des contraintes dans le tendon est démontrée lorsqu'une charge mesurée dans

un tendon diminue avec le temps alors que la déformation reste constante.

Le fluage est affecté par l'intensité de la force, tandis que la relaxation des contraintes est affectée par l'intensité de la déformation. Une méthode plus complète d'évaluation du fluage et de la relaxation des contraintes consiste à effectuer des essais dynamiques en faisant varier l'intensité de la force. L'examen de ces propriétés sur une plage d'intensités fournit un aperçu plus approfondi des caractéristiques viscoélastiques de l'échantillon.

Enfin, les essais de fatigue sont un autre type d'essais cycliques qui consistent à effectuer des cycles dans une plage définie de forces ou de déplacements (inférieure à la contrainte de rupture quasi-statique) et à enregistrer le nombre de cycles jusqu'à la rupture. Ils sont réalisés sur une longue période et comprennent de nombreux cycles (p. ex. 11h et plus de 10^5 cycles [133]). Il en résulte un endommagement progressif et localisé de la structure du matériau. Les essais de fatigue caractérisent la capacité du matériau à résister à cette sollicitation cyclique. Plusieurs modes de sollicitation peuvent être utilisés, comme la flexion, la traction, la compression et la torsion. Cependant, ces tests sont rarement utilisés sur les tendons dans la littérature à cause de la difficulté à maintenir l'échantillon de tissu dans la pince de test sans glissement [133].

Au cours de ces tests de fatigue, les tendons connaissent trois phases marquées par des changements de rigidité [136]. Initialement, la rigidité du tendon augmente, atteint un maximum et finalement diminue, démontrant un comportement triphasique. Cette diminution de la rigidité est attribuée à une accumulation de dommages de sous-rupture, ce qui entraîne une augmentation de la déformation et une diminution de la rigidité avant la rupture. Ces tests sont utiles pour caractériser les tendons qui subissent des charges répétitives, comme le tendon d'Achille et d'autres tendons qui fonctionnent en locomotion [137].

Avant de décider d'un protocole de test mécanique, il faut clarifier les questions auxquelles on souhaite que ces tests répondent : savoir si la mécanique tissulaire suggère une viscoélasticité tissulaire normale nécessitera de regarder par exemple l'hystérèse, le module élastique (Young ou dynamique) et la relaxation suite à une élongation. Effectuer un test de rupture ne sera alors pas nécessaire. Par contre, si la question est de savoir si le tendon permettra un retour à des activités "normales", il faudra s'assurer que la charge et la contrainte maximale sont plus élevées que ce à quoi l'on pourrait s'attendre lors de ces activités [138].

Malgré un large éventail de propriétés mécaniques entre et au sein des espèces, certaines études comme celle de LaCroix *et al.* suggèrent que le module d'élasticité et la contrainte à la rupture sont fortement corrélés [139]. Cela suggère que la rupture du tendon dépend fortement de la déformation et qu'il est possible de prédire raisonnablement la contrainte à la rupture uniquement à partir du module d'élasticité.

Ne pas effectuer de test à la rupture présente un avantage considérable dans le cadre d'études animales. En effet, rester dans la zone linéaire de déformation et effectuer uniquement des tests mécaniques qui n'impactent pas la structure du tendon permet de réutiliser le même tendon pour des tests subséquents (p. ex. histologie, μCT, ...). De cette façon, le nombre d'animaux nécessaires à une étude peut être significativement diminué. Cette réduction s'inscrit dans le principe éthique des "trois Rs" (*Replacement*, *Reduction* and *Refinement*) visant à conduire des études animales plus respectueuses [140].

2.9.3 Propriétés mécaniques du tendon supra-épineux

Comme pour les autres tendons, la contrainte à la rupture est la technique la plus fréquemment utilisée dans la littérature pour étudier le tendon SST.

Cependant, les forces qui s'appliquent à la coiffe des rotateurs sont multidirectionnelles [141] et, si le tendon supra-épineux est soumis principalement à la traction, il est également soumis à la compression, au cisaillement et à la friction [142]. De plus, différentes zones d'un même tendon peuvent être soumises à des contraintes uniques [142]. Par exemple, lors d'un conflit sous-acromial ou lorsqu'il s'enroule autour de la tête humérale, le tendon supra-épineux est soumis à la compression proche de son point d'insertion à l'os [143]. Il a été démontré que sa structure n'est pas homogène et qu'elle s'est adaptée aux contraintes subies [142].

Deux études par Lake *et al.* montrent que les propriétés mécaniques longitudinales et transverses du tendon supra-épineux varient spatialement et sont corrélées au degré d'alignement des fibres de collagène [134, 144]. Ceci démontre un lien important entre la structure et la fonction des tendons. Lake *et al.* ont analysé les propriétés longitudinales et transverses de 6 zones du tendon. Ils ont premièrement séparé le côté inférieur (côté articulation, J) et le côté supérieur (coté de la bursa, B) du tendon, puis ont séparé ces deux surfaces en trois zones, la zone antérieure (A), la zone postérieure (P) et la zone médiale (M). Comme anticipé, la comparaison des propriétés longitudinales et transverses démontre l'anisotropie du tendon (voir Figure 2.23 : les modules de Young longitudinaux sont largement plus élevés que les transverses pour les zones médiales (MJ et BJ, $\sim 10^3$ fois supérieures) ainsi que pour les zones du côté inférieur (AJ et PJ). Par contre, les propriétés transverses et longitudinales apparaissent identiques pour la zone antérieure et la zone postérieure du côté supérieur (AB et PB). Une mécanique planaire isotrope semble donc intervenir dans cette zone. Ces propriétés semblent propres au tendon supra-épineux et ne sont pas observées pour les autres tendons.

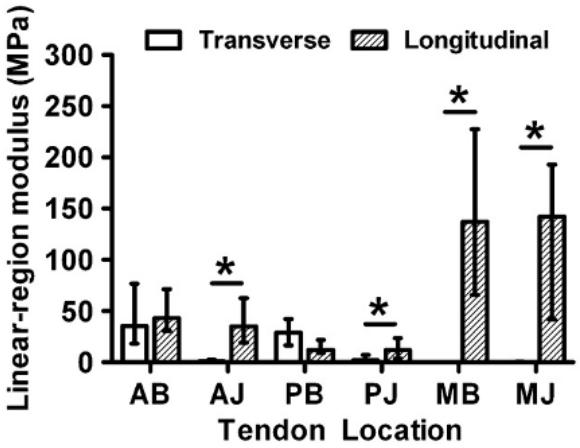


FIGURE 2.23 Le module de Young du tendon supra-épineux varie selon l'orientation du chargement et selon la zone du tendon. 6 régions sont ici comparées : antérieure supérieure, antérieure inférieure, postérieure supérieure, postérieure inférieure, médiale supérieure et médiale inférieure. Reproduit de S. P. Lake et al., "Tensile properties and fiber alignment of human supraspinatus tendon in the transverse direction demonstrate inhomogeneity, nonlinearity, and regional isotropy," *Journal of Biomechanics*, vol. 43, no. 4, p. 727–732, 2010, avec la permission de Elsevier [134].

Une autre étude menée par Itoi *et al.* comparant uniquement les côtés inférieurs et supérieurs du tendon supra-épineux a démontré que le côté supérieur possède un module de Young inférieur au côté inférieur, mais une contrainte et une déformation à la rupture supérieure [145]. Bey *et al.* ont montré que l'élongation du tendon varie sur son épaisseur, suggérant la présence de cisaillement dans le tendon au cours d'un chargement longitudinal [146]. Newton *et al.* ont observé que la rigidité et le module de Young du tendon supra-épineux décroissent lorsque l'angle de test augmente pour différentes orientations du tendon, allant de 0° (correspondant à une abduction de 90°) à 90° (correspondant à 0° d'abduction) [147]. Lee *et al.* ont analysé la rigidité du tendon en compression suite à un test d'indentation [143]. Les tendons ont été indentés en 15 locations, sur leur côté inférieur et supérieur. La rigidité s'est révélée inhomogène et ne suit pas le même profil des deux côtés.

La variation spatiale des propriétés mécaniques du tendon supra-épineux résulte probablement des chargements complexes et multiaxiaux appliqués *in vivo* à la coiffe des rotateurs. En effet, le tendon supra-épineux ne fait pas que supporter un chargement longitudinal selon l'axe prédominant de ses fibres de collagène, il est aussi soumis à des chargements en dehors de cet axe. Ces chargements sont probablement responsables des modifications structurelles du tendon qui améliorent ses propriétés mécaniques dans des orientations complexes. Il est possible qu'en réponse aux chargements complexes qu'il subit, le tendon supra-épineux possède

une répartition de ses fibres de collagène plus complexe que d'autres tendons [148]. Cependant, ce phénomène entraîne une diminution des propriétés mécaniques du tendon lorsqu'il est contraint selon son axe principal.

La déformation locale du tendon peut être obtenue par corrélation d'image numérique ("digital image correlation", DIC) [149]. Cette technique optique permet de suivre des motifs (taches) aléatoirement répartis sur l'échantillon au cours du temps et d'en déduire la déformation de l'échantillon, comme illustré à la Figure 2.24. Cette technique semble peu utilisée pour déterminer les propriétés du tendon supra-épineux dans la littérature, mais a été utilisée sur d'autres tendons (p. ex. pour le tendon d'Achille humain [149]) ou d'autres tissus (un exemple de résultat obtenu pour un matériau composite de cellulose est montré à la Figure 2.25). La DIC peut entre autres etre utilisee pour mesurer la deformation reelle du tendon en prenant en compte l'effet de glissement du tissu dans les pinces.

La contrainte en compression est considérée comme un facteur important menant à la déchirure de la coiffe des rotateurs [143]. Pourtant, si de nombreuses études ont analysé le comportement du tendon durant une contrainte en tension, peu se sont intéressées à la réponse du tendon à la compression et au cisaillement [142]. Il est cependant important d'utiliser des tests mécaniques permettant d'analyser la résistance à chacun de ces trois chargements [150, 151], car ils peuvent tous entraîner une dégénération du tendon [152] ou l'empêcher de se réparer.

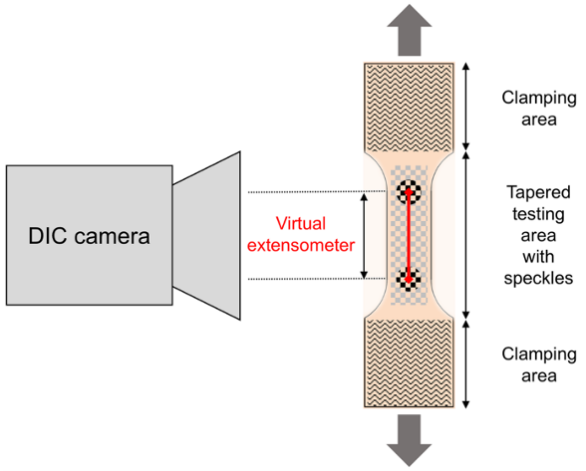


FIGURE 2.24 Principe de la DIC : une caméra enregistre des images de l'échantillon pendant sa déformation. En évaluant la distribution des taches à sa surface, le système peut calculer un champ de déformation. Ici, la déformation nominale (rapport entre l'allongement global et la longueur initiale de l'échantillon) est également calculée par deux points placés aux extrémités de l'échantillon, sur l'axe de traction (formant un extensomètre virtuel). Image issue de Scholze *et al.* [133].

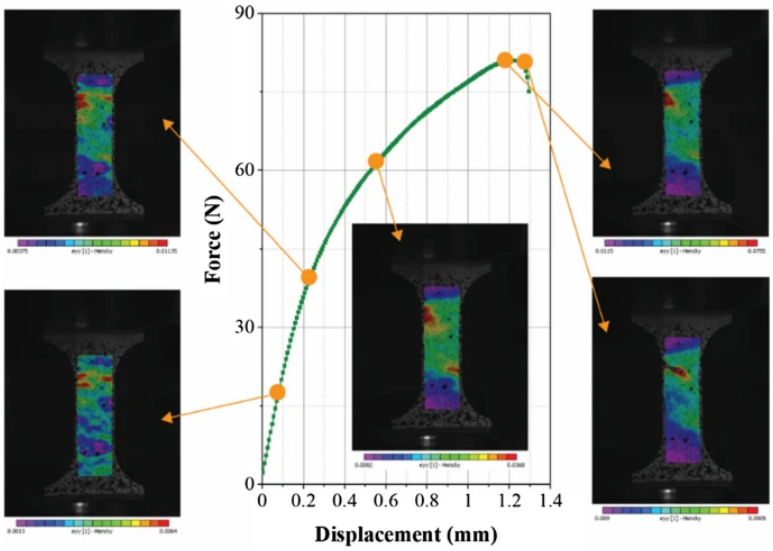


FIGURE 2.25 Résultat de la DIC sur un échantillon de composite de cellulose. La courbe contrainte-déformation nominale est tracée, et le champ de déformation local est montré pour plusieurs étapes avant rupture du matériau. Image issue de Chen *et al.* [153].

Les tests cycliques de fatigue apporteraient également une information intéressante. Cependant, aucune étude de fatigue n'a été trouvée dans la littérature pour le tendon SST.

2.10 Le tissus osseux [5]

Chez les vertébrés, les os ont pour fonction de soutenir le corps, mais aussi de protéger les organes thoraciques, le système nerveux central et le tissu hématopoïétique. De plus, le tissu osseux est irrigué par des vaisseaux sanguins, il contribue à l'équilibre phosphocalcique et produit des messagers chimiques (p. ex. hormones).

La matrice extracellulaire du tissu osseux est composée d'une fraction organique et d'une fraction minérale. Cela lui confère ses propriétés particulières : il est à la fois rigide, flexible, et légèrement élastique. Malgré sa rigidité apparente, le tissu osseux est en remaniement continu, ce qui lui permet d'assurer ses fonctions au cours du temps et de surmonter les fractures.

2.10.1 Matrice extracellulaire osseuse

La fraction organique représente environ 22% de la matrice extracellulaire osseuse, et la fraction minérale en représente environ 69% [155]. C'est la combinaison des propriétés méca-

5. Section basée sur l'article "Bone structure, development and bone biology" écrit par Safadi *et al.* [154]

niques de ces deux phases qui donne au tissu osseux ses propriétés uniques. Le tissu osseux contient également environ 9% d'eau (très variable selon l'âge et le degré de minéralisation de l'os) [155].

La fraction organique

Le principal composant de la fraction organique est le collagène de type I. Il représente à lui seul 90% des macromolécules osseuses [156]. Outre le collagène, le tissu osseux est composé d'autres protéines fibreuses, telles l'élastine et la fibronectine, ainsi qu'une substance interfibrillaire formée de glycosaminoglycanes (GAG) et de protéines non fibreuses telles l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocacline et les sialoprotéines osseuses. Ces molécules peuvent induire ou inhiber la minéralisation [156].

À l'échelle microscopique, on peut distinguer trois types de tissus osseux selon l'agencement du collagène au sein de la matrice extracellulaire :

— Le tissu osseux réticulaire est la forme immature du tissu osseux, présenté à la Figure 2.26 (gauche). Les fibres de collagène y sont désorganisées. Les cellules y semblent disposées de façon aléatoire. Cet os est caractérisé par une faible résistance mécanique. On le trouve chez le foetus ou lors de la réparation de fractures [156].

— Le tissu osseux lamellaire est la forme mature du tissu osseux, présenté à la Figure 2.26 (droite). Il se compose de couches circulaires concentriques, appelées lamelles osseuses, formant des structures cylindriques appelées ostéons. Au sein d'une lamelle, les fibres de collagène sont parallèles entre elles. Elles forment par contre des angles proches de 90° avec les fibres des lamelles adjacentes (voir Figure 2.27). Cela confère à cet os une grande résistance mécanique [156]. Les ostéons formant le tissus lamellaire comprennent un canal central (canal de Havers), dans lequel se trouvent artères, veines et nerfs (voir Figure 2.27). Les canaux de Havers sont reliés entre eux par des canaux transversaux (canaux de Volkmann). L'arrangement concentrique des lamelles osseuses autour des canaux de Havers est déterminé par la disposition du collagène.

— Le tissu osseux fasciculaire. Il est connecté aux tendons ou aux ligaments, et les fibres de collagènes de ces différents tissus s'entremêlent [157].

C'est l'orientation des fibres de collagène, parallèles les unes aux autres au sein de lamelles, qui confère à l'os lamellaire sa capacité de résister aux forces de tension (vers l'extérieur selon l'axe principal de l'os) [158]. L'orientation des fibres est directement liée aux contraintes mécaniques subies par l'os.

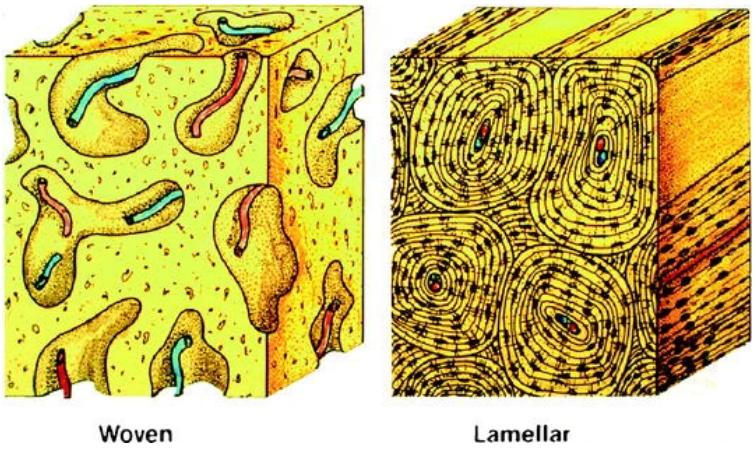


FIGURE 2.26 Gauche : os réticulaire (ou immature) dont l'organisation ne présente pas de structure distincte. Droite : os lamellaire (ou mature) présentant une structure organisée de façon circulaire. Reproduit de F. F. Safadi *et al.*, "Bone structure, development and bone biology," *Bone pathology*, p. 1–50, 2009, avec la permission de Springer Nature [154].

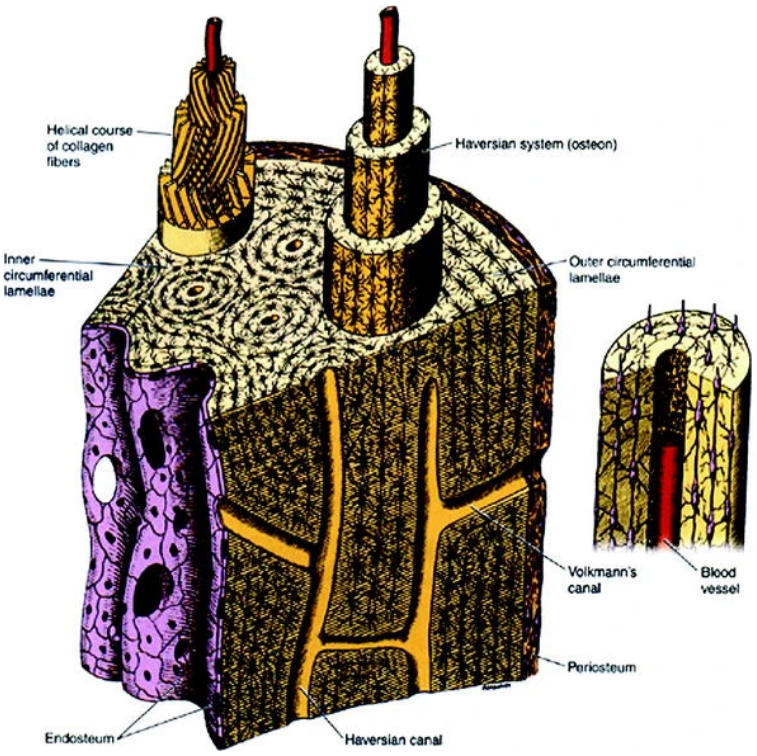


FIGURE 2.27 Schéma de l'os lamellaire. Les fibres de lamelles adjacentes présentent des orientations presque perpendiculaires. Au centre de chaque ostéon se trouve un canal (canal de Havers), contenant vaisseaux sanguins, nerfs et vaisseaux lymphatiques Reproduit de F. F. Safadi *et al.*, "Bone structure, development and bone biology," *Bone pathology*, p. 1–50, 2009, avec la permission de Springer Nature [154].

La fraction minérale

Le réseau fibreux formé par le collagène favorise la minéralisation par la fixation de cristaux d'hydroxyapatite (HPA) sur et entre les fibres [155]. L'HPA résulte de la précipitation de calcium et d'hydroxyde de phosphate. Ce sont ces cristaux, sorte de petites aiguilles hexagonales, qui confèrent sa dureté et sa rigidité au tissu osseux.

La fraction minérale offre à l'os une importante résistance à la compression (vers l'intérieur selon l'axe principal de l'os). Elle est cependant hautement susceptible de cassure. C'est la balance entre la fraction minérale et la fraction organique qui empêche la rupture de l'os.

2.10.2 Morphologie macroscopique des os longs

Les os longs, comme l'humérus, sont typiquement constitués de trois parties :

- La diaphyse, partie centrale cylindrique.
- Les épiphyses, extrémités arrondies et plus larges que la diaphyse. Elle sont couvertes de cartilage articulaire.
- Les métaphyses, régions coniques liant la diaphyse et les épiphyses.

À l'échelle macroscopique, on distingue :

- L'os cortical (ou compact) qui possède une porosité entre 5 et 30%. On le trouve principalement dans la paroi de la diaphyse.
- L'os trabéculaire (ou spongieux) qui possède une porosité entre 30 à 90%. Il constitue surtout le centre de la diaphyse et les régions métaphysaires et diaphysaires.

Les trois parties de l'os et les deux types d'os macroscopiques sont illustrés à la Figure 2.28.

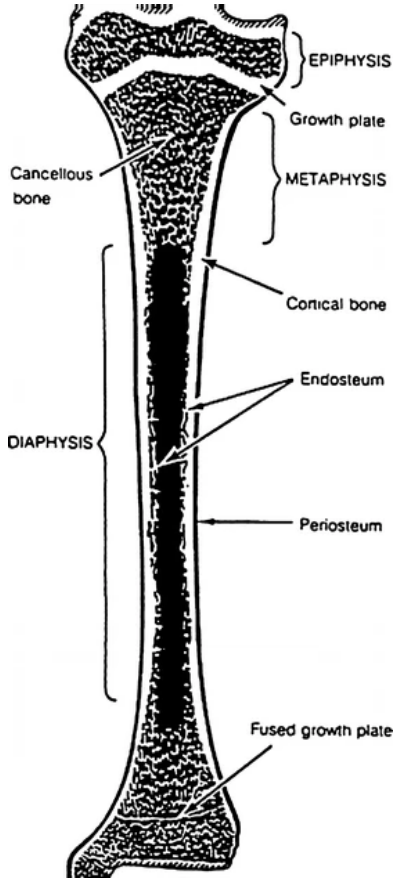


FIGURE 2.28 Schéma d'un os long (ici tibia) et de ses trois parties : la diaphyse, les épiphyses et les métaphyses. On y retrouve deux structures macroscopiques de l'os : l'os cortical, compact, et l'os trabéculaire ("cancellous bone"), spongieux. Reproduit de F. F. Safadi *et al.*, "Bone structure, development and bone biology," *Bone pathology*, p. 1–50, 2009, avec la permission de Springer Nature [154].

2.10.3 Les cellules osseuses et le remodelage osseux

Il y a principalement 4 types de cellules osseuses :

- Les cellules ostéoprogénitrices
- Les ostéoblastes
- Les ostéocytes
- Les ostéoclastes

Les cellules ostéoprogénitrices sont des cellules souches qui peuvent se différencier en ostéoblastes et en ostéocytes.

Les ostéoblastes produisent la fraction organique de la matrice extracellulaire et assurent sa minéralisation.

Lors de la synthèse de la matrice, les ostéoblastes meurent, retournent à un état de repos sur les surfaces osseuses, ou restent “emprisonnés” dans la matrice qu'ils ont synthétisée. Dans ce dernier cas, ils se différencient en ostéocytes. Les ostéocytes possèdent de longs prolongements cellulaires qui leur permettent de communiquer entre eux ou avec les ostéoblastes. Leur activité métabolique, bien que plus faible que celle des ostéoblastes, participe au renouvellement continu de la matrice.

Les ostéoclastes résorbent le tissu osseux en dissolvant les minéraux et en digérant la matrice organique. Il s'agit de cellules géantes et plurinucléées dérivées des monocytes sanguins.

Ce remodelage osseux permet aux os de s'adapter aux contraintes imposées par leur environnement. Un os qui ne subit pas de contraintes journalières (p. ex. un os dans le plâtre) va perdre une partie de sa masse.

2.10.4 Réparation osseuse

Deux mécanismes peuvent prendre place après une fracture osseuse : l'ossification intramembraneuse et l'ossification endochondrale. L'ossification intramembraneuse concerne les très petites fractures (de l'ordre de 10 à 100 μm) subissant de très faibles contraintes mécaniques [159]. Elle implique la synthèse directe de tissu osseux par les ostéoblastes. Les fractures plus importantes sont principalement réparées en suivant le mécanisme de l'ossification endochodrale. La réparation d'un os fracturé se déroule alors en quatre étapes, schématisées à la Figure 2.29 :

1. Formation d'un hématome : Lorsqu'un os se fracture, les vaisseaux sanguins au site de la fracture se rompent et saignent, formant un caillot sanguin. Ce caillot scelle les vaisseaux sanguins brisés et isole les extrémités de l'os, entraînant la mort des cellules osseuses privées de nutriments.
2. Formation d'un tissu fibrocartilagineux : Quelques jours après la fracture, des capillaires se développent dans l'hématome et des cellules phagocytaires éliminent les débris cellulaires. Les fibroblastes et les ostéoblastes arrivent sur le site de la blessure : les fibroblastes produisent des fibres de collagène qui relient les extrémités de l'os, tandis que les ostéoblastes commencent à générer de l'os spongieux. Le cal fibrocartilagineux, une masse de réparation intermédiaire composée de cartilage hyalin et fibrocartilagineux, rempli la fracture.
3. Formation du cal osseux : Progressivement, le cal fibrocartilagineux est remplacé par un cal osseux spongieux. Ce processus, qui dure environ deux mois chez l'Homme, solidifie les extrémités de l'os cassé en les reliant, à l'instar de la manière dont le cartilage se transforme en os durant la croissance.

4. Le cal osseux nouvellement formé est remodelé par les ostéoclastes et les ostéoblastes, qui enlèvent l'excès de matériau osseux à la surface de l'os et dans la cavité interne. Ce remodelage, qui peut se poursuivre sur plusieurs mois ou années, permet de reconstituer un os lamellaire compact et lisse, similaire à l'os original.

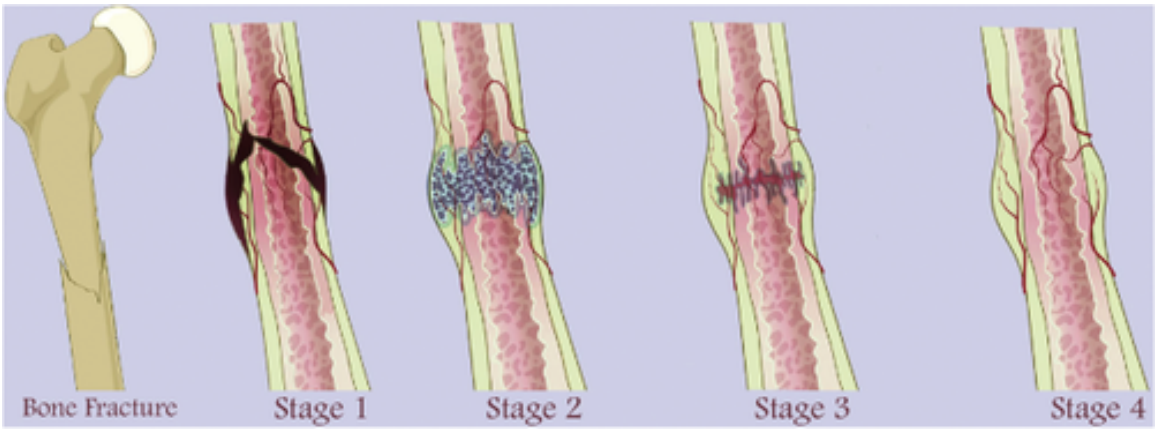


FIGURE 2.29 Les 4 étapes de la réparation des fractures osseuses. 1 : formation d'un caillot sanguin et présence d'inflammation. 2 : remplacement du caillot par un tissu mou, fibrocartilagineux. 3 : le cal fibrocartilagineux est remplacé par un cal osseux, fibrillaire. 4 : remodelage et conversion de l'os fibrillaire en os lamellaire. Image issue de Bigham-Sadeg *et al.* [160].

2.10.5 Ossification hétérotopique

Le développement, la maintenance et la réparation osseuse peuvent être « déréglés » et mener soit à une atrophie osseuse (p. ex. ostéoporose) soit à une production excessive d'os [161]. Une pathologie liée à la production excessive de tissu osseux est l'ossification hétérotopique (HO). Il s'agit d'une formation extrasquelettique d'os. On retrouve alors des fragments osseux localisés là où il n'y en a normalement pas, au sein de tissus mous. L'ossification hétérotopique peut survenir à la suite d'un dommage aux tissus mous, par exemple une lésion de la coiffe des rotateurs (RC). La prévalence de l'HO suite à une chirurgie de la RC est de 6% [162]. La Figure 2.30 montre la présence d'HO dans le muscle deltoïde suite à une chirurgie de la RC.

Le mécanisme de développement de l'HO est encore mal compris et faiblement caractérisé dans la littérature [163].

Une hypothèse répandue dans la littérature est que l'HO des tendons et des ligaments survient par une ossification endochondrale, comme lors de la réparation osseuse [163]. Cette ossification commence par la différentiation et l'hypertrophie des chodrocytes, remplacés ensuite par les ostéoblastes.

La littérature s'accorde pour dire que l'HO advient probablement à la suite d'un processus

de réparation raté des tissus mous, et commence par l'inflammation [161, 163]. Le degré de gravité de l'ossification hétérotopique est corrélé à la gravité de la blessure et à l'inflammation qui s'en suit [164]. La réponse immunitaire innée, et plus spécifiquement la réponse des macrophages, est nécessaire à la formation d'HO [165]. Les macrophages stimulent des gènes pro-chodrogéniques et pro-ostéogéniques et l'activation des cellules ostéo-progénitrices.

Il a été démontré que l'élimination des macrophages inhibe la formation d'HO [166]. Le même phénomène est observé lors de l'utilisation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens [167].

Un autre facteur qui semble essentiel au développement d'HO est la stimulation mécanique (surcharge, mouvements répétitifs, etc.) [163]. Il est fréquent d'observer de l'HO chez les athlètes, ou à la suite d'une blessure aux tendons ou aux ligaments. Il a été démontré *in vitro* que les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les cellules souches tendineuses peuvent être poussées à se différentier en lignées chodrogéniques ou ostéogéniques à la suite de stimulus mécaniques [168]. De plus, la signalisation mécanotransductive et les propriétés de la matrice extracellulaire, comme l'alignement du collagène, jouent un rôle essentiel dans la différenciation des lignées cellulaires [169].

En résumé, en cas d'HO, le recrutement de MSC causé par une blessure et l'inflammation qui s'en suit, mène à une différenciation ostéo-chodrogénique en réponse à une chaîne de cascades de signalisation cellulaires complexe, impliquant divers facteurs de croissance et cytokines inflammatoires [163]. La formation de l'ossification hétérotopique est alors similaire au processus de réparation osseuse : trauma, inflammation, recrutement des MSC, différenciation chondrogénique et ossification.

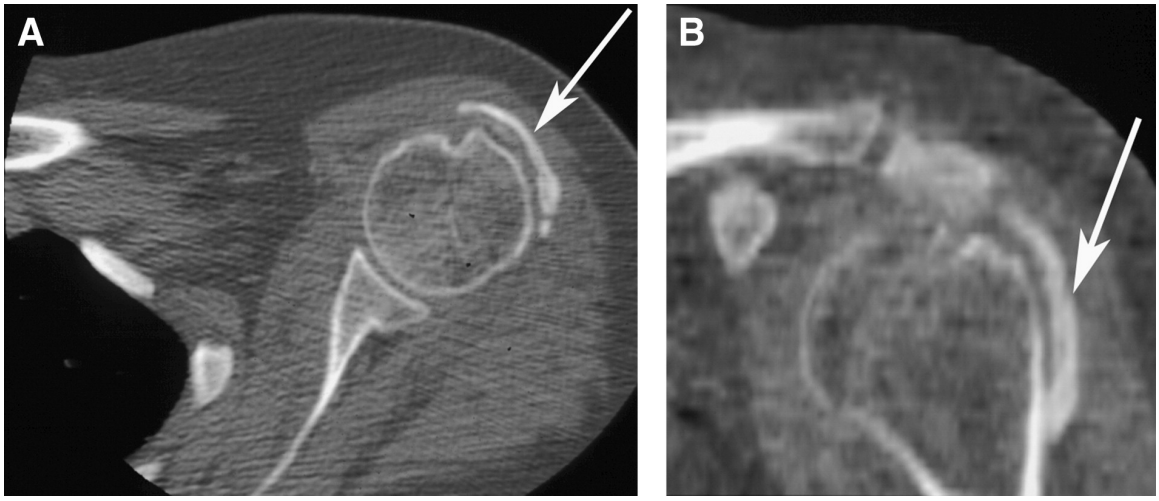


FIGURE 2.30 Exemple d'ossification hétérotopique suite à une chirurgie "mini-open" de la coiffe des rotateurs. (A) Tomodensitométrie de l'ossification hétérotopique du muscle deltoïde en vue axiale. (B) Reconstruction paracoronale. La flèche blanche indique le tissu ossifié. Reproduit de J. Kircher, V. Martinek et W. Mittelmeier, "Heterotopic ossification after minimally invasive rotator cuff repair," *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 23, no. 12, p. 1359–e1, 2007, avec la permission de Elsevier [170].

2.11 Histologie des tendons [6]

Les tendons, ainsi que leur enthèse et les tissus environnants, présentent une grande variété de caractéristiques, notamment sur le plan de la rigidité. Cette diversité complique le choix des techniques histologiques appropriées. L'histologie des tendons doit permettre de différencier les tissus tendineux des tissus musculaires, osseux et cartilagineux. De plus, elle doit faciliter l'examen de la zone de transition de l'enthèse, des cellules et de la structure du tendon afin d'évaluer l'inflammation, la dégénérescence, la fibrose ou une réaction de corps étranger vis-à-vis d'un implant.

L'analyse histologique implique plusieurs étapes : la fixation des tissus, l'inclusion (ou "embedding") et enfin, la coloration.

2.11.1 Fixation et inclusion

La fixation est importante pour préserver la morphologie des cellules et des tissus. Il existe divers fixatifs, dont le choix dépend de la taille, de la densité de l'échantillon et de la nature des tissus à conserver. Par exemple, l'éthanol est un fixatif efficace, mais il modifie les fibres

6. Section basée sur l'article "Histology of tendon and enthesis—Suitable techniques for specific research questions" de Angrisani *et al.* [171]

de collagène, ce qui entraîne une perte d'alignement et rend ce fixatif inapproprié pour les tissus tendineux. Le fixatif le plus couramment utilisé est la formaline tamponnée en raison de son coût faible et de sa facilité d'utilisation et de conservation, bien qu'elle soit un produit carcinogène.

Pour l'inclusion, on peut utiliser la cryopréservation, la paraffine ou le plastique. Les techniques classiques de cryopréservation sont efficaces pour les tissus mous, mais elles peuvent endommager les tissus plus rigides. En revanche, si les échantillons sont rapidement congelés ("flash-freeze") directement après leur prélèvement, il n'est pas obligatoire de recourir à l'étape de fixation.

La méthode la plus courante est l'inclusion en paraffine, adaptée à presque tous les types de tissus et bénéficiant de nombreux protocoles de coloration. Cependant, pour les échantillons contenant du tissu osseux, une décalcification préalable est nécessaire avant l'inclusion. On utilise alors un agent chélateur comme l'EDTA ou un acide.

Pour les échantillons comprenant du tissu non décalcifié ou un implant métallique, l'inclusion dans le plastique est privilégiée. Bien que cette technique soit moins courante et requière un savoir-faire spécialisé, elle est compatible avec toutes les techniques de coloration.

La Figure 2.31 résume les différentes techniques d'inclusion et propose un guide pour sélectionner la méthode la plus adaptée selon le type d'échantillon tendineux à analyser.

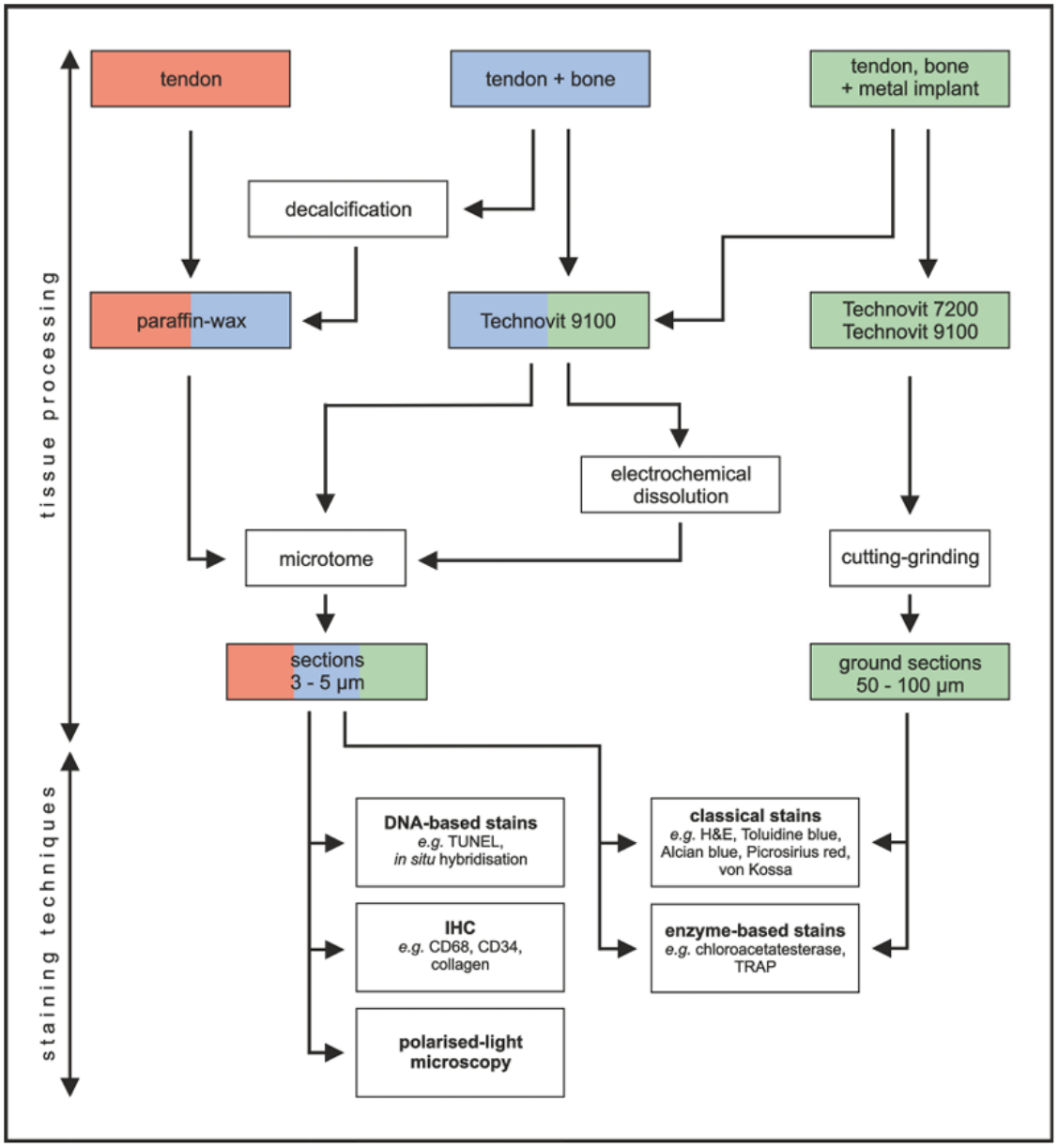


FIGURE 2.31 Guide pour la sélection de la méthode d'inclusion la plus adaptée selon le type d'échantillon tendineux à analyser. Image issue de Angrisani *et al.* [171].

2.11.2 Coloration

En général, il est souhaitable de commencer par une analyse globale des tissus, avant de se concentrer sur une évaluation plus détaillée des cellules impliquées et de la structure tissulaire. Selon l'objectif de l'étude, diverses colorations peuvent être choisies pour répondre à ces trois objectifs distincts (analyse globale, structurelle et cellulaire).

Les changements les plus fréquents associés à une tendinopathie incluent la déstructuration des fibres de collagène, une augmentation de la vascularité, la présence de glycosaminoglycanes (GAGs) et des ténocytes de forme plus arrondie. Ce sont généralement ces aspects que l'on cherche à observer en priorité.

Les différentes colorations et leurs objectifs sont détaillés ci-dessous. La Figure 2.32 fournit également un récapitulatif des options disponibles.

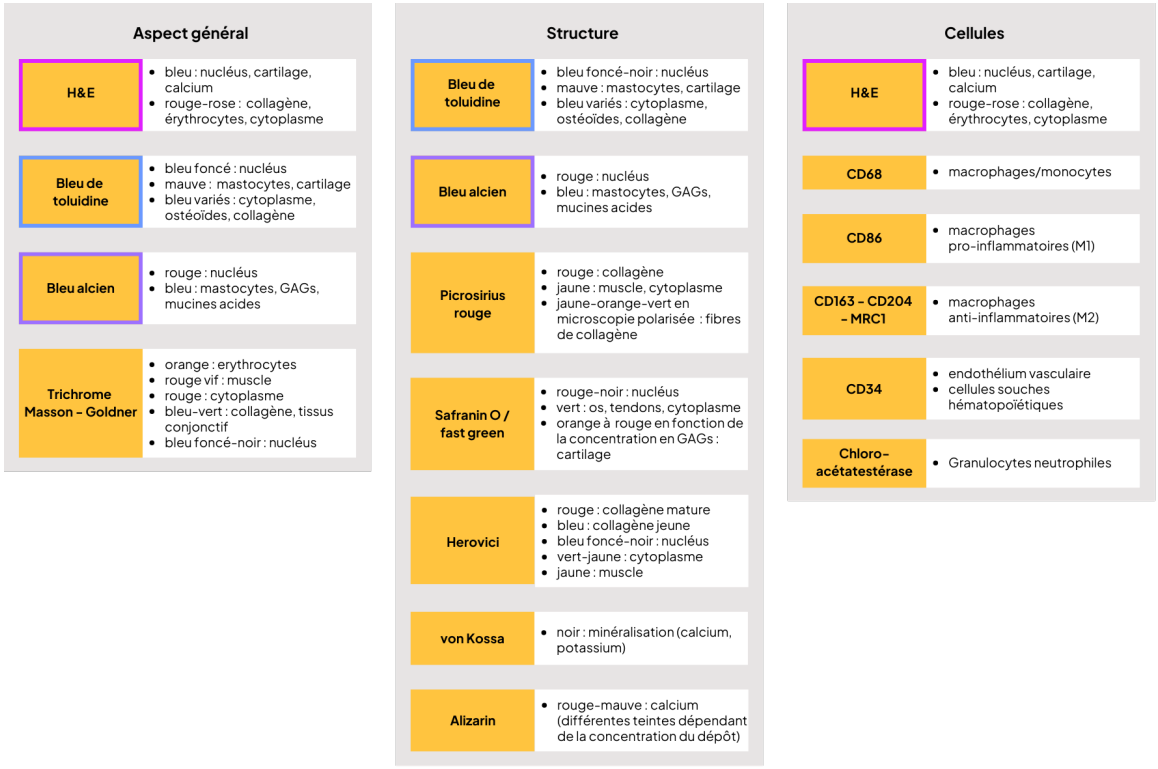


FIGURE 2.32 Techniques d'histologie fréquemment utilisées pour l'étude des tendons. Image inspirée de Angrisani *et al.* [171].

2.11.3 Analyse générale

Pour une analyse générale, il est recommandé d'utiliser des techniques à base de colorants, dont l'usage est bien connu de la littérature et pour lesquels les protocoles sont bien établis. La coloration la plus couramment employée est la coloration H&E (hématoxyline et éosine), qui permet de différencier et identifier la plupart des cellules et de se faire une première idée de la structure du tissu.

Une autre technique utile est la coloration au bleu de toluidine. Si l'échantillon contient du tissu osseux, cette coloration est particulièrement informative, car elle permet de distinguer

les différentes étapes de la minéralisation, en colorant l'ossification, la calcification et les tissus mous dans des nuances variées de bleu ou mauve.

La coloration au bleu alcian, quant à elle, fournit peu d'informations détaillées sur les cellules, mais est efficace pour révéler la présence de glycosaminoglycanes (GAGs).

Enfin, la coloration trichrome Masson-Goldner offre une distinction très nette entre les différents types cellulaires et leur structure, tels que l'os minéralisé, l'os nouvellement formé, le cartilage et le muscle. Cette coloration est souvent utilisée en complément de la coloration H&E ou du bleu de toluidine pour une analyse plus approfondie.

2.11.4 Structure

La principale cause d'échec des chirurgies des tendons est souvent une réparation non structurée du tissu tendineux et de l'enthèse. Il est donc crucial d'analyser la structure des tendons de manière précise. La microscopie polarisée permet d'observer cette structure directement, sans nécessiter de coloration préalable. Cependant, combiner cette technique avec une coloration comme le picrosirius rouge peut accentuer les détails des structures tendineuses. Un exemple de coloration au picrosirius rouge, avec ou sans microscopie polarisée, est présenté à la Figure 2.33.

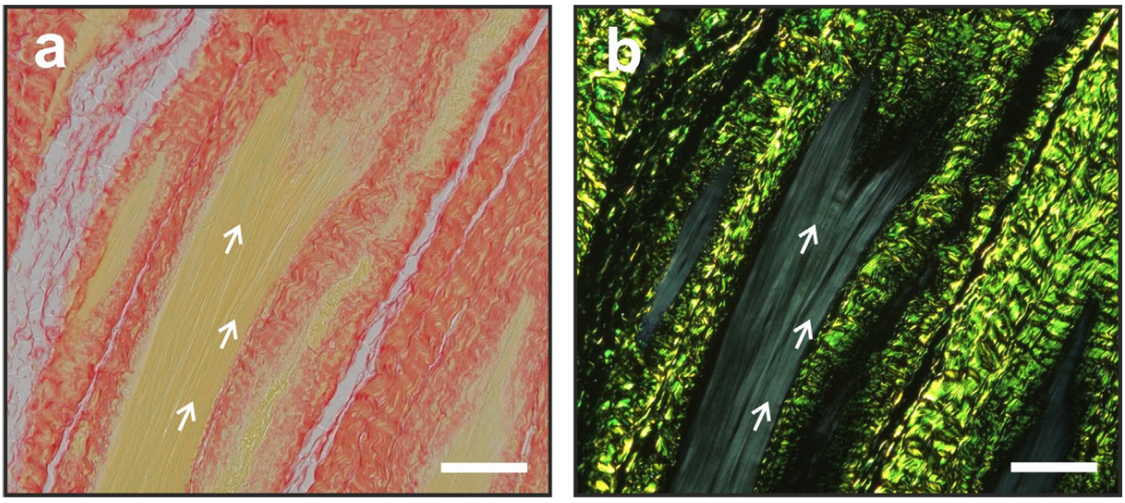


FIGURE 2.33 Utilisation de la microscopie polarisée pour l'étude de la zone de transition tendon-muscle d'un infraspinatus de mouton (barre d'échelle = 100 μm). (a) Un échantillon uniquement coloré au Picrosirius Rouge.(b) Le même échantillon avec une imagerie complémentaire réalisée par microscopie polarisée. Image issue de Angrisani *et al.* [171].

Une autre méthode simple pour visualiser le collagène est la coloration Herovici. Cette tech-

nique distingue le collagène mature (en rouge) du collagène immature (en bleu), ce qui est utile pour suivre le développement du nouveau tissu tendineux.

Pour une évaluation plus spécifique des modifications dans la structure du cartilage, la coloration Safranin O/Fast green est souvent employée. Le Safranin O colore les substances cartilagineuses de rose à rouge selon leur concentration en glycosaminoglycanes (GAGs), permettant une analyse détaillée des changements structurels du cartilage. Il teinte en outre les noyaux cellulaires en rouge foncé et les chondrocytes en rouge pâle. En contraste, le Fast green ne colore pas le cartilage, mais teint l'os minéralisé et les tissus conjonctifs en vert, offrant un contraste marqué avec le Safranin O.

Parmi les colorations standards permettant une analyse générale (décrites précédemment), le bleu de toluidine et le bleu alcian offrent également une bonne visualisation de la structure des tendons.

Il est également important d'examiner spécifiquement la structure de l'enthèse. La Figure 2.34 illustre une enthèse d'infraspinatus intacte colorée par H&E et observée avec ou sans microscopie polarisée (Figure 2.34 a et b, respectivement), ainsi qu'une enthèse observée 8 semaines après chirurgie, colorée au bleu de toluidine et vue avec ou sans microscopie polarisée (Figure 2.34 c et d, respectivement).

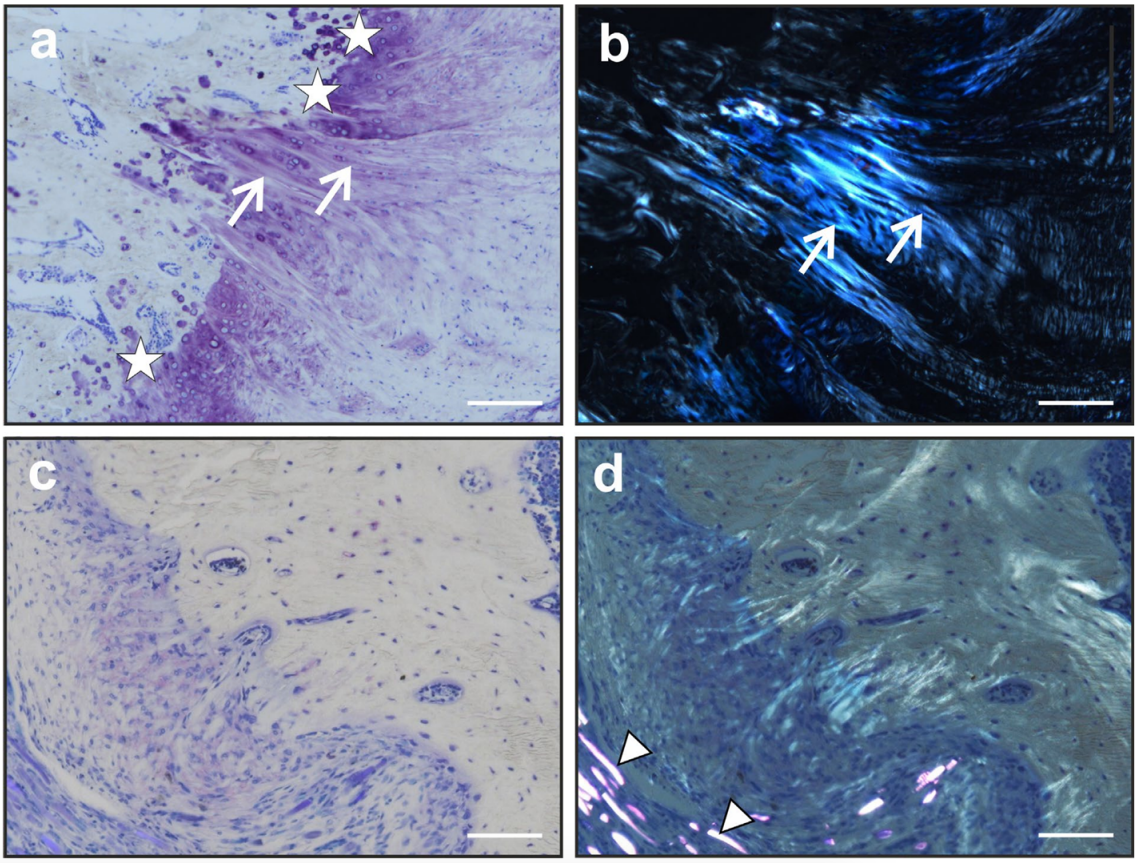


FIGURE 2.34 Utilisation de la microscopie polarisée pour l'étude de l'enthèse d'un infraspinatus de rat (barre d'échelle = 100 μm). Enthèse intacte colorée par H&E et observée avec (a) ou sans (b) microscopie polarisée. Enthèse 8 semaines après chirurgie, colorée au bleu de toluidine et vue avec (c) ou sans (d) microscopie polarisée. Image issue de Angrisani *et al.* [171].

2.11.5 Cellules

Durant le processus inflammatoire, plusieurs types cellulaires sont souvent présents, notamment les mastocytes, les macrophages et les neutrophiles. Un observateur expérimenté peut généralement les distinguer avec une simple coloration H&E. Cependant, pour les quantifier et les identifier avec précision, une coloration immunohistochimique est requise. Par exemple, l'anticorps CD-68 est couramment utilisé pour la détection des macrophages dans les tendons. Pour une analyse plus détaillée, le CD-86 permet d'identifier les macrophages pro-inflammatoires, tandis que les anticorps CD-163, CD-204 et MRC-1 sont utilisés pour les macrophages anti-inflammatoires. De plus, les granulocytes neutrophiles peuvent être détectés par coloration enzymatique au chloroacétate estérase. La coloration enzymatique est une technique qui permet de détecter indirectement des enzymes, et donc les cellules qui

les produisent. Un substrat spécifique à l'enzyme est ajouté et prend une teinte différente lorsqu'il est clivé, permettant sa détection.

La vascularisation est également un paramètre crucial à observer, car son augmentation est associée au processus de réparation tissulaire. En effet, la vasculature fournit de l'oxygène et des nutriments au site de la blessure, qui est généralement faiblement vascularisé. Les vaisseaux sanguins peuvent être identifiés par une simple coloration H&E. Cependant, pour quantifier et analyser leur distribution, une coloration immunohistochimique est souvent nécessaire. L'anticorps CD-31 est fréquemment utilisé pour la détection des vaisseaux sanguins dans les tendons.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1 : ROBUST SEGMENTATION-FREE ALGORITHM FOR HOMOGENEITY QUANTIFICATION IN IMAGES

© 2021 IEEE. Reprinted, with permission, from Fiona Milano, Anik Chevrier, Gregory De Crescenzo, and Marc Lavertu, Robust segmentation-free algorithm for homogeneity quantification in images, IEEE Transactions on Image Processing, June 2021.

Authors : Fiona Milano, Anik Chevrier, Gregory De Crescenzo, and Marc Lavertu*

Manuscript received October 9, 2020 ; revised April 27, 2021 ; accepted May 20, 2021. Date of publication June 8, 2021 ; date of current version June 14, 2021. This work was supported in part by the Ortho Regenerative Technologies and in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The work of Fiona Milano was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council–Collaborative Research and Training Experience (NSERC-CREATE) PrEEmiuM Program. The associate editor coordinating the review of this manuscript and approv- ing it for publication was Prof. Sos S. Agaian. (Corresponding author : Marc Lavertu.)

F. Milano is with the Biomedical Engineering Institute, Polytechnique Montreal. A. Chevrier is with the Chemical Engineering Department, Polytechnique Montreal. G. De Crescenzo and *M. Lavertu are with the Chemical Engineering Department and the Biomedical Engineering Institute, Polytechnique Montreal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada (e-mail : marc.lavertu@polymtl.ca).

Acknowledgement : F. Milano thanks Robert Milano for providing statistical advices and Sebastian Suarez for kindly providing the nanocomposites images used in Figure 3.9.

Author Contributions : Conceptualization, F.M., A.C. and M.L. ; Methodology, F.M., A.C. and M.L. Software, F.M. ; Validation, F.M., A.C. and M.L. ; Formal Analysis, F.M. ; Investigation, F.M. ; Resources, M.L. ; Data Curation, F.M. ; Writing – Original Draft Preparation, F.M. ; Writing – Review & Editing, A.C., M.L. and G.D.C. ; Visualization, F.M. ; Supervision, M.L. and G.D.C ; Project Administration, M.L. ; Funding Acquisition, M.L.

Détail de la contribution de F. Milano : Recherche bibliographique ; conceptualisation ; méthodologie ; expérimentation ; analyse des données ; utilisation de logiciels ; validation ; visualisation ; rédaction.

Keywords : Chitosan, Dispersion, Homogeneity, Image analysis, Nanomaterials, Statistical analysis

3.1 Abstract

Objective : Homogeneity is a notion used to describe images in various fields and is often linked to critical aspects of those fields. However, this term is rarely defined in the literature and no gold standard exists for its quantification. A few quantification algorithms have been proposed, but they lack both simplicity and robustness. As a result, the scientific community uses the notion of homogeneity in subjective analysis, preventing objective comparison of a large number of data or of different studies. The main objectives of this manuscript are to propose a definition of homogeneity and an algorithm for its quantification. Method : This algorithm, called MASQH, rely on a multi-scale, statistical and segmentation-free approach and outputs a single homogeneity index, which makes it robust and easy to use. Results : The performance and reliability of the method are demonstrated through three case studies : Firstly, on synthetic images to study the behavior and assess the relevance of the algorithm in diverse situations and hence, in various potential fields. Secondly, on histological images derived from experimental chitosan-platelet-rich-plasma hybrid biomaterial, where the quantitative results are compared to a qualitative classification provided by an expert in the field. Thirdly, on experimental nanocomposites images for which results are compared to two other homogeneity quantification algorithms from the field of nanocomposites. Conclusion and significance : By quantifying homogeneity, the MASQH method may help to compare disparate studies in the literature and quantitatively demonstrate the impact of homogeneity in various fields. The MASQH method is freely available online.

3.2 Introduction

Homogeneity is a parameter used to describe images in various fields, such as tissue engineering [2, 172–174], composites and nanocomposites materials [175–178], cancer histopathology [179–181], or even the food industry [182, 183]. This parameter is often critical. In tissue engineering, it may affect the mechanical properties and the biodegradation of the biomaterials as well as tissue response. For composites and nanocomposites materials, it has been observed that the dispersion of particles influences the performance and the reliability of the composites [184]. In cancer histopathology, the aggressiveness of a cancer can be linked to the heterogeneity of the cancerous tissue [179–181]. In the food industry, it has been reported that the repartition of intramuscular fat content in meat influences the food palatability [182].

Even though the literature in each cited field acknowledges the crucial role of homogeneity in their analysis, most descriptions of homogeneity are qualitative. To allow for an objective and repeatable measure of homogeneity in images, several quantitative methods have been

presented in the literature, mainly in the field of nanocomposites and of texture analysis [175–178, 185–196]. However, they often lack simplicity, robustness [178, 179, 182] and versatility. Many require to accurately assign optimal values to a number of parameters that depend upon the nature of the image, need a training database or make a number of assumptions that prevent their application to a broad range of situations. This likely explains that, to our knowledge, no standard has been established for the quantification of homogeneity in any of the cited fields.

Besides, most of those methods start with binarized images in which black objects of interest are spread on a white background. This binarization process requires segmentation. However, segmentation is often challenging, and a specific segmentation algorithm will not perform well on every layout [197, 198]. Algorithms relying on segmentation are therefore less robust.

Furthermore, to our knowledge, none of the qualitative and quantitative methods described in the literature are based on a definition of the notion of homogeneity. They are rather all based on the authors' perception of what homogeneity is. This subjectivity can lead to inconsistencies and contradictions in the published literature of a given field, as shown by Burris *et al.* for the field of nanocomposites [199]. This lack of objectivity prevents scientists to compare efficiently disparate studies and to analyze large amounts of data

Based on these observations, the objectives of this manuscript are 1) to propose a definition for the notion of homogeneity and 2) to propose a simple-yet-robust algorithm to quantify the homogeneity of an image. This algorithm is based on a straightforward statistical, multi-scale approach. The key idea behind the proposed method is that it does not require a prior segmentation of the image. The method is called MASQH (Multi-scale Algorithm for Segmentation-free Quantification of Homogeneity).

The efficacy of MASQH was assessed by applying it to 1) synthetic images mimicking situations occurring in various fields, 2) experimental histological images obtained in our laboratory, showing molecules of chitosan (CS) dispersed in chitosan/platelet-rich-plasma (PRP) hybrid biomaterials [2] and 3) nanocomposites images collected by Rossi *et al.* [178]. In this case, the MASQH results are compared to those computed with two other algorithms, one developed by Khare and Burris [176] and the other by Rossi *et al.* [178]. The proposed algorithm was translated into a user-friendly MATLAB™ application and a code freely available (`https://github.com/Biomaterials-and-Cartilage-Laboratory/MASQH`)

3.3 Definition and motivation

3.3.1 Homogeneity definition

While homogeneity of grayscale images represents a critical factor in numerous fields, the concept is rarely defined. Qualitative and even quantitative characterization of homogeneity are proposed in the literature without a description of the concept under study [200]. Those characterizations are often issued from empirical methods, depending on the context, the field under study and even the scientist performing the analysis. The lack of definition is therefore problematic, as it can lead to as many characterization methods as there are scientists using the notion of homogeneity. By proposing a definition of homogeneity for grayscale images, our goal is to transform a subjective notion into an objective one. This will facilitate the analysis of a large number of data but also, more importantly, it will allow for an objective comparison of the studied images.

Homogeneity is always associated to the notion of uniformity. However, perfect uniformity is an illusion. For example, solid particles on a plane will never lead to a perfectly uniform material [116]. Homogeneity is also characterized with respect to a property of interest [201]. For example, if the objects under study are trees in a forest, the characterization of their homogeneity will certainly be different if the property studied is the trees' height or color. We therefore call something "homogeneous" when it *appears* that any of its subparts are identical with respect to a given property, up to a certain scale [202]. Alternatively, something will be called inhomogeneous if the studied property varies with the chosen subparts.

In the case of image analysis, the property of interest is often the observed gray levels. We therefore propose the following mathematical definition for homogeneity for grayscale images : *a grayscale image is homogeneous when it is made of sub images having identical gray level cumulative distribution function.* The cumulative distribution function is chosen as its range of value does not depend on the sample size. However, the cumulative distribution function could vary with the sub-image. Sub-images being, among others, characterized by their size, it is therefore clear that homogeneity is a function of scale. The proposed definition is used in the rest of this article.

3.3.2 Motivation for a segmentation-free algorithm

Most existing algorithms for homogeneity quantification start with a segmented image. However robust and accurate segmentation is difficult to achieve [203]. There is currently no segmentation method leading to satisfying results for all kind of images [204]. For example, in the case of stained CS PRP hybrid biomaterials, several factors prevented us from finding

a segmentation method that was both robust and precise on most images. First, histological images often show noise and artifacts introduced both during the preparation process of the immunological slides (dehydration, paraffination, sectioning and staining) and image acquisition. Second, the staining process is subjected to experimental variability and the color of each classes as well as the contrast between them can vary in a significant way between experiments. Finally, the morphology and size of the CS aggregates can also vary significantly between experiments. Precise and robust segmentation is also difficult to obtain for other fields, even though they face different challenges [205–208]. For most fields, the number or the size of the obtained images does not allow a manual segmentation [204]. As mentioned above, one aim of this paper is to develop and render available an algorithm allowing for a robust homogeneity quantification that does not rely on segmentation.

3.4 Method

3.4.1 Proposed algorithm

The proposed method is based on two principles arising from the given definition for homogeneity. The first one is that our perception of homogeneity depends on the scale. For example, some surfaces that seem uniform from far away can show texture when observed from closer. They therefore seem homogeneous at one scale but not at another. The second principle is that if an image is homogeneous, two of its sub-images of the same size should 'look the same'. From a statistical point of view, it means that the histograms of the pixels' gray-level composing these sub-images should originate from the same distribution. From these principles, two large sub-images taken from a given image could lead to histograms derived from the same distribution while two smaller sub-images could lead to histograms derived from different distributions. This is qualitatively illustrated in Figure 3.1.

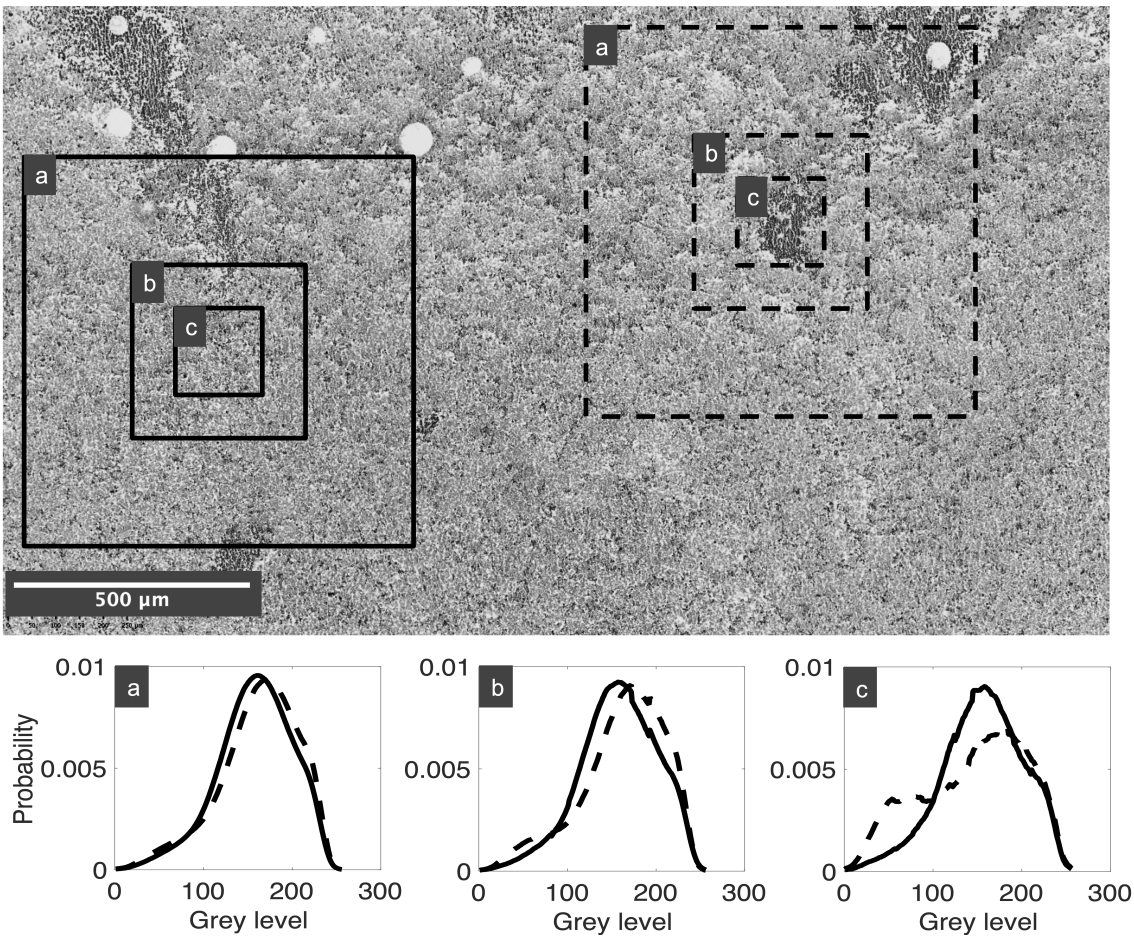


FIGURE 3.1 Illustration of the principles underlying the proposed method : our perception of homogeneity depends on the scale at which we look at an image. At a bigger scale, the histograms associated with two sub-images are generally more likely to be issued from the same distribution than at a smaller scale where more discrepancies are observed. This is qualitatively illustrated for bigger scales by the histograms of grey levels of squares (a), which are alike. Squares (b), taken at an intermediate scale, still lead to similar histograms. However, when a smaller scale is considered as for squares (c), the histograms no longer seem similar, which reflect the fact that the squares (c) does not contain similar sub-images. A moving average over 20 values was performed on the histograms for clarity purpose.

Figure 3.2 presents a flowchart of the whole MASQH algorithm. A single channel (e.g. issued from RGB, HIS or HSV color space depending on the field or on the imaging instrument) of the initial image (3.2(a)) showing the highest contrast is first extracted (if RGB) to obtain a greyscale image (Figure 3.2(b)). The most suitable channel (or combination of channels) and color space could vary depending on the nature of the images. However, the same channel should be used for every image to be compared for their homogeneity. The image is then analyzed at k different scales, corresponding to decreasing sizes. For each scale, an even

number n of squares of the same size are randomly placed in the image. Their center positions are randomly chosen, and the squares are then constructed from them as shown in Figure 3.2(c). As homogeneity is a function of scale, the sub-images being compared must have the same size. Therefore, the squares can overlap but must be entirely contained in the image. A number x of pixels' value (i.e. gray level) is randomly chosen in each square (data collection represented in Figure 3.2(d)) and used to compute a histogram of gray levels. The n squares are then randomly coupled (Figure 3.2 2(e)), and all coupled histograms are compared through a Kolmogorov-Smirnov (KS) test (Figure 3.2(f)). The null hypothesis H_0 is that the samples come from the same intensity distribution. The p-value threshold was set to 0.05. For each scale, the proportion of p-values bigger than 0.05 is computed, as shown in Figure 3.2(g). This corresponds to the proportion of histogram pairs for which H_0 was not rejected. For those pairs, the test does not reject homogeneity. The bigger this proportion, the more uniform the image is at that scale. The mean of the k proportions obtained for the different scales was chosen as the index quantifying the overall homogeneity of the image. If it is close to 0, the image is not uniform at most scales and is therefore inhomogeneous. If it is close to 1, the image is uniform at most scales and is therefore homogeneous.

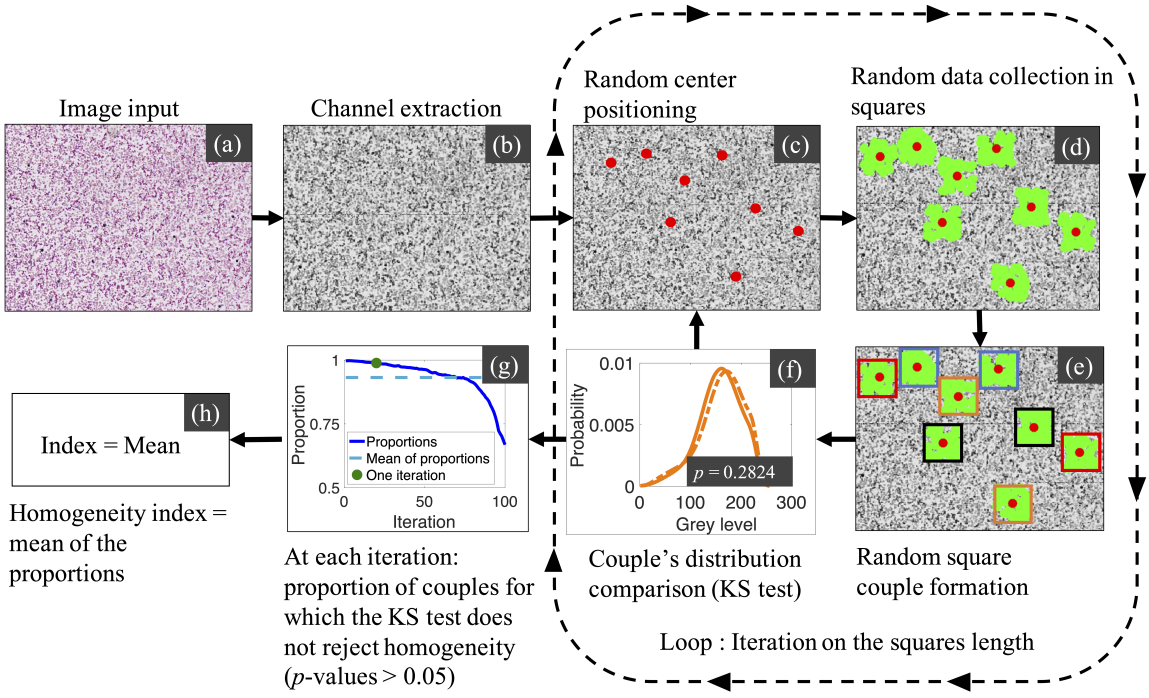


FIGURE 3.2 Flowchart depicting the MASQH method for the quantification of homogeneity. (a) The input image can be RGB or grayscale; (b) if RGB, one channel is extracted (here the green channel); iteration on steps (c-f) : one iteration corresponds to a specific analysis at a given size (i.e. a specific square length); (c) location of squares is randomly chosen; (d) pixels are randomly chosen in squares of the given length and their values form a dataset; (e) squares are randomly coupled; (f) the histograms of each couple's dataset are compared through a Kolmogorov-Smirnov (KS) test; the next iteration (c-f) corresponds to another square length; (g) the proportion of couples leading to a p-value > 0.05 given by the KS test is plotted for each square length. One iteration (c-f) leads to one proportion (green dot). After several iterations, the obtained proportions from a curve (plain blue curve); (h) the homogeneity index is the mean of the computed proportions (dashed blue line on (g)). Images presented in this flowchart were chosen for clarity purpose. Note that images (f) and (g) are not issued from the analysis of squares shown on (c-e).

The algorithm uses five parameters : l_{min}, the minimal square length, l_{max}, the maximal square length, n, the number of squares used in the analysis, k, the number of square sizes used in the analysis and x, the number of points taken per squares to form a histogram of gray levels. As it will be shown in the next section, only one of these parameters, l_{min}, is field-dependent and has to be set by the user. The other parameters are empirically fixed, and the algorithm is robust to a change in their values. The overall algorithm can be summarized as follows :

1: $Grayscale \leftarrow$ green channel of the image to analyze

2: $l_{min} \leftarrow$ minimal square length
3: $l_{max} \leftarrow$ maximal square length
4: $l \leftarrow$ vector of k values evenly spread between l_{min} and l_{max} then rounded
5: **for** $i = 1$ to k **do**
6: n squares of length $l(i)$ are randomly placed in $GreyScale$. n is an even number
7: x points are randomly chosen per square and the histogram of their values is computed
8: the squares are randomly coupled, and each couple's histogram are compared with a KS test, leading to $n/2$ p-values
9: The proportion of p-values > 0.05 is computed : proportions(i) $\leftarrow$ (number of p-values > 0.05 / total number of p-values), k proportions are thus obtained in the end
10: **end for**
11: $Index \leftarrow mean$(proportions)

The KS test is here chosen for three reasons : 1) It is a non-parametric test, no assumptions have to be made on the unknown compared distributions, 2) it can be used with large sample size, and 3) it has a good sensitivity as it is sensitive to both the shape and the location of the cumulative distribution functions of the samples [209]. However, one should note that non-parametric tests are more robust (i.e. one has less chances to use it wrong) but less powerful than parametric tests. This means that non-parametric tests are less likely to lead to a justified rejection of H_0 (given the same dataset, the p-value is often higher than for parametric test). The test statistic used by the KS test is :

$$D_{n,m} = \sup_x |F_{1,n}(x) - F_{2,m}(x)| \tag{3.1}$$

where $F_{1,n}$ et $F_{2,m}$ are the empirical cumulative distribution function of each dataset, $\sup_x$ is the supremum function and n and m are the size of the two compared datasets (in our case $n = m$). For large samples, H_0 is rejected if

$$D_{n,m} > c(\alpha)\sqrt{\frac{n+m}{n \cdot m}} \tag{3.2}$$

with $c(\alpha) = \sqrt{-\frac{1}{2}\ln\frac{\alpha}{2}}$. For $\alpha = 0.05$, $c(\alpha) = 1.358$.

3.5 Choice and influence of the algorithm parameters

The influence of the aforementioned five parameters on the MASQH results was theoretically examined. The influence of k, n, and x on the homogeneity index's robustness was also examined using an extensive dataset of 60 images issued from diverse fields, as described in

Supplementary Information 2 (Annexe C). Only one of those parameters is field-dependent :

l_{min}, the length of the smallest square used in the analysis. This should correspond to the smallest size that makes sense to be analyzed. A smaller size would detect inhomogeneities one does not want to take into account. Examples of how this square's length is determined are given in the result and discussion section.

l_{max} is the length of the largest square used in the analysis. It is fixed as half the smallest image dimension. This length is chosen not to prioritize any image's dimension. Indeed, if the horizontal direction were larger than the vertical one, larger squares would detect horizontal inhomogeneities sooner than vertical ones.

k is the number of square's lengths used in the analysis, evenly spread between l_{min} and l_{max}. The computation time is directly proportional to k. As shown in Figure C.1 of Supplementary Information 2 (Annexe C), except for small k values, the index's value does not depend on k. Moreover, the final index's variance is inversely proportional to k, as demonstrated by Equation 3.8. A value of $k = 100$ was chosen to ensure a small index's variance.

x is the size of the dataset (i.e. number of pixels) taken in each square to form the grayscale histogram. Based on Equation 3.2, small datasets will lead to a permissive test which will reject H_0 only when comparing datasets with major differences. On the contrary, large datasets will lead to a strict test which will reject H_0 for the slightest difference observed between the two datasets. This phenomenon is shown in Figure C.3 of Supplementary Information 2 (Annexe C). A tradeoff therefore must be found to reach a sensitive analysis. Experimental data shown in C.3 of Supplementary Information 2 (Annexe C) demonstrated that a dataset containing between 5000 and 10000 data allows to reach acceptable results. $x = 5000$ was here chosen as it allows for a shorter computation time and a sufficient discrimination for our needs (CS-PRP hybrid clot's histology). This value must be kept constant to perform a robust comparative analysis of a set of images.

n is the number of squares used in the analysis. As shown in Figure C.2 of Supplementary Information 2 (Annexe C), except for small n values, the index's value does not depend on n. The final index's variance is inversely proportional to n. Indeed, for a given square length l, by randomly choosing a couple of squares we construct a Bernoulli process : $X_1 = 1$ when p-value > 0.05, $X_1 = 0$ otherwise. This Bernoulli process is defined by a parameter p_1, where p_1 is here the real unknow probability to have a p-value > 0.05. We now consider i couples of squares. To each couple is associated a Bernoulli process X_j with parameter p_j.

Those parameters are not necessarily equal for every couple as the image is not necessarily

homogeneous. The proportion of p-values > 0.05 is the mean of the X_j. The processes X_j being independent, the variance of the mean is

$$\text{var}\left(\text{mean}(X_i)\right) = \text{var}\left(\frac{1}{i}\sum_{j=1}^{i} X_j\right) = \frac{1}{i^2}\sum_{j=1}^{i}\text{var}(X_j) \tag{3.3}$$

where $i = n/2$ is the number of square couples used in the analysis. We now change the number of squares by multiplying the number of couples i by a factor m. The variance of the mean is now :

$$\text{var}\left(\text{mean}(X_i)\right) = \text{var}\left(\frac{1}{mi}\sum_{j=1}^{mi} X_j\right) = \frac{1}{m^2i^2}\sum_{j=1}^{mi}\text{var}(X_j) \tag{3.4}$$

If i is sufficiently large, we can assume that

$$\sum_{j=1}^{mi}\text{var}(X_j) = m \cdot \sum_{j=1}^{i}\text{var}(X_j) \tag{3.5}$$

Indeed, when i is high enough, the squares scan the whole picture, thus, no new value of p_j appears when using mi couples (i.e. no new processes). Therefore :

$$\begin{aligned}\text{var}\left(\text{mean}(X_{mi})\right) &= \frac{1}{m^2i^2}\sum_{j=1}^{mi}\text{var}(X_j) = \frac{m}{m^2i^2}\sum_{j=1}^{i}\text{var}(X_j) \\ &= \frac{1}{mi^2}\sum_{j=1}^{i}\text{var}(X_j) = \frac{1}{m}\text{var}(\text{mean}(X_i))\end{aligned} \tag{3.6}$$

Therefore, from Equation 3.6, the final index's variance is inversely proportional to the number of couples (mi) and of squares ($2mi$). However, the number of squares is directly proportional to the execution time. A tradeoff therefore has to be found between precision and execution time.

An upper bound can be computed for the final index's variance. As described above, to each couple is associated a Bernoulli process X_j with parameter p_j. The variance of this Bernoulli process is var(X_j)=$p_j(1-p_j)$. It therefore takes a maximal value of $\frac{1}{4}$ when $p_j = \frac{1}{2}$. The final proportion at a given iteration is the mean of $n/2$ values (as there are $n/2$ couples) each equal to 1 or 0. The maximal variance of these proportions is therefore

$$\begin{aligned} \text{var}\left(\text{mean}(X_j)\right) &= \text{var}\left(\frac{2}{n}\sum_{j=1}^{n/2} X_j\right) = \frac{4}{n^2}\sum_{j=1}^{n/2}\text{var}(X_j) \\ &\leq \frac{4}{n^2}\sum_{j=1}^{n/2}\frac{1}{4} = \frac{1}{2n} \end{aligned} \tag{3.7}$$

The final index is the mean of k proportion. The maximal variance of this index is therefore, for $k = 100$ and $n = 400$:

$$\text{var}_{max}(index) = \frac{1}{2nk} = \frac{1}{80000} = 1.25 \cdot 10^{-5} \tag{3.8}$$

The upper bound of the standard deviation is therefore of 0.0035 or 0.35%. This upper bound could be lowered by increasing the kn product, which would increase the computation time. The value of $kn = 40000$ used in this paper leads to a standard deviation with an order of magnitude of 10^{-3} for an execution time of about 17 seconds (experimental values obtained on a MacBook Pro computer with a 1.4 GHz Intel 4 Cores i5 and 16 GB RAM).

The description and value of all five parameters are summarized in Table 3.1. l_{min} should be adjusted depending on the smallest scale making sense to be analyzed in the image regarding the nature of the object of interest. Depending on the targeted final index precision, k and n could be increased. Values for k, x and n are optimized for 8-bit images (i.e. 256 gray levels). Therefore, images with larger color map are handled by the algorithm by using a histogram having 256 bins.

Based on Equation 3.8 and on experimental data, two types of robustness of the algorithm are further assessed in Supplementary Information 2 (Annexe C) : 1) the index's stability regarding a change in the value of a parameter and 2) the index's ability to discriminate two images as the value of a parameter changes.

Tableau 3.1 Description and value of the parameters

Parameters	Definition	Value	Description
l_{min}	Minimal analysis length	100 pixels	Linked to the characteristics of the objects of interest. Field dependent. Once chosen, should be constant for every image being compared.
l_{max}	Maximal analysis length	Half the smallest image dimension	Defined as half the smallest image dimension to avoid the prioritization of one image's dimension. Could be smaller. Once chosen, should be constant for every image compared.
k	Number of square sizes used in the analysis (i.e. number of iterations)	100	For a kn product sufficiently high, k does not influence the index's value. Moreover, it is inversely proportional to the index variance (at the expense of a longer execution time). A kn product of 40000 for example leads to a variance in the order of 10^{-5}.
x	Number of points taken per square to form a histogram	5000	Linked to the sensitivity of the KS test. Recommended range of values : between 5000 and 10000. Once chosen, should be constant for every image being compared.
n	Number of squares used at each iteration of the analysis	400	For a kn product sufficiently high, n does not influence the index's value. Moreover, it is inversely proportional to the index variance and directly proportional to the execution time. A kn product of 40000 for example leads to a variance in the order of 10^{-5}.

3.6 Results and discussion

3.6.1 Assessment of the behavior and relevance of MASQH from synthetic images

The algorithm was first applied to 15 synthetic images (Figure 3.3 and 3.4). All images (725x670 pixels) were generated using the R software [210]. In Figure 3.3, the algorithm is applied to 9 different types of distribution. Those aim at representing situations occurring in various fields. They are all made of the same objects' density : 2050 darker points distributed on a background of 250000 lighter points randomly uniformly distributed. The difference in the images' index is therefore only due to the objects' spatial distribution. For every image, the smallest square's size was set as the smallest size allowing to contain four objects in Figure 3.3(a). Figure 3.3(a) represents a periodic distribution, the most homogeneous distribution possible with point objects. It is often described as the targeted unrealistic distribution in the literature [175–178]. The proportions of p-value > 0.05 starts to differ slightly from 1 only for small square sizes, as observed in Figure 3.3(j). This shows that the image's texture is only seen at a small scale. At a larger, more global scale, the image is considered perfectly homogeneous. The final index is therefore close to 1 (index = 0.9848). Figure 3.3(b) shows a random uniform distribution. This distribution is often seen in literature as the most homogeneous of the realistic distributions [175, 176, 201]. The evolution of the proportion of p-value > 0.05 is similar to the one of Figure 3.3(a) : the proportion also decreases for smaller square size, but more rapidly than for the periodic distribution, leading to a smaller final index (0.9524). Figure 3.3(c) represents a clustered periodic distribution, where each cluster is made of a two-dimensional (2D) gaussian. Figure 3.3(d) follows the same process, except that the gaussian are less spread (they have a smaller variance), leading to an agglomerated periodic distribution. In each of these two images, two clusters' center are 90 pixels apart. As expected, the index for those two images is smaller than for Figure 3.3(a,b), the images are therefore considered less homogeneous. However, the periodicity they show leads to a high index. This index is higher for Figure 3.3(c) than for Figure 3.3(d) as the latter leads to more separated clusters (index of 0.8839 and of 0.8109 respectively). The peaks observed on the graph of the evolution of the proportion (Figure 3.3(k)) corresponds to analysis sizes that are multiples of the spatial frequency of the cluster (i.e. multiples of 90 pixels). Figure 3.3(a-d) all show a proportion of p-value > 0.05 close to 1 for small square size, as seen in Figure 3.3(j). They all have a high final index and are therefore homogeneous. Figure 3.3(e-i) all have lower final indexes. They could be classified as more or less homogeneous or not homogeneous. Even for large square size, none of these images show proportions close to 1. This means that even at a large scale, the algorithm perceives texture and non-uniformities in those images.

Figure 3.3(e) and (h) both show agglomerated random distributions. Each agglomeration has a random size, shape and density. However, the random placement of the agglomeration led to a more uniform scenario in Figure 3.3(e) than in Figure 3.3(h) where few agglomerations are found in the bottom left corner. This explains the index difference between Figure 3.3(e) and Figure 3.3(h) (0.4771 and 0.3029 respectively). The evolution of the proportion of p-value > 0.05 (Figure 3.3(k)) shows that this difference is mostly due to the large analysis scales. Indeed, for the first iteration (largest scale), the proportion of Figure 3.3(e) is close to 0.75 while the proportion of Figure 3.3(h) is below 0.5. The difference between those two proportions decreases with the analysis scale. At the smaller scales, starting around the 80th iteration, both image's proportions have a similar behavior, ending at around 0.45. Figure 3.3(e) is also judged more homogeneous than (f) and (g) because the clusters tend to be uniformly spread while Figure 3.3(f) and (g) both show a gradient, which is inhomogeneous by definition as the point density changes for every vertical axis. In (f) the gradient spreads in two directions from the middle of the image, generating a vertical symmetry. In (g), it spreads in a single direction from the image's left border. The symmetry of (f) makes the two-way gradient more homogeneous (index of 0.4264) than (g) (index of 0.3780). Indeed, in (g), to be judged similar, two squares must have their center in similar horizontal position. However, in (f), to be judged similar, two squares must be at a similar distance from the axis of symmetry, whether they are on the same side of this axis (they therefore are in similar horizontal position), or not. The evolution of the proportion of p-value > 0.05 (Figure 3.3(k)) shows that this difference is mostly observed for large analysis scales. The difference between those two proportions decreases with the analysis scale and, starting around the 50th iteration, both image's proportions have a similar behavior. Figure 3.3(i) represent the least homogeneous image, as every object is part of a single non-homogeneous cluster, here taking the shape of a two-dimensional gaussian (index of 0.2408).

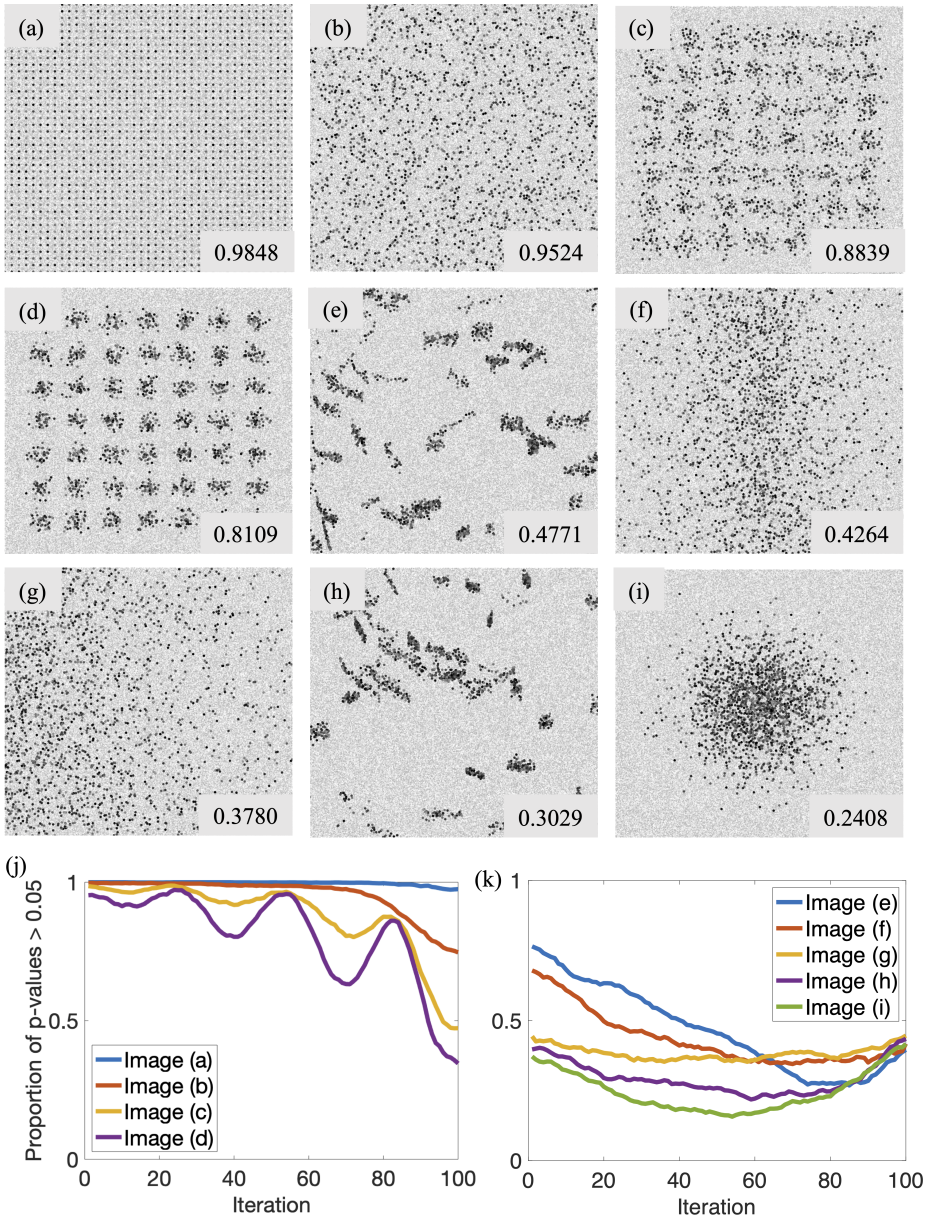


FIGURE 3.3 Varying dispersion of particles in synthetic images. The images size is of 725x670 pixels. The smaller square length was set to 40 pixels, which is the smallest size that always contains four darker points in (a). The corresponding homogeneity indexes are shown for each image. Images are all made of 2050 darker points figuring objects which spatial distribution varies and of 250000 lighter points randomly uniformly distributed, forming the background. (a) periodic distribution ; (b) random uniform distribution ; (c) clustered periodic distribution ; (d) agglomerated periodic distribution (e) ; agglomerated random distribution (f) vertical two-way gradient (g) horizontal one-way gradient ; (h) agglomerated random distribution ; (i) centered two-dimensional gaussian distribution ; (j) Evolution of the proportion of p-values > 0.05 for images (a-d). The peaks observed on the graph for images (c) and (d) corresponds to analysis size which are multiples of the spatial frequency of the cluster (90 pixels) ; (k) Evolution of the proportion of p-values > 0.05 for images (e-i).

In Figure 3.4, the influence of the objects' density on MASQH's result is studied. The density varies from 4 times less to 2 times more than in Figure 3.3. Results are shown for a homogeneous distribution (the random uniform distribution of Figure 3.3(b)) in Figure 3.4(a-c) and for an inhomogeneous distribution (the centered two-dimensional Gaussian of Figure 3.3(i)) in Figure 3.4(d-f). One can see that for the homogeneous distribution, decreasing the objects' density decreases the homogeneity index. Indeed, as the objects are uniformly spread in the image, a smaller number of objects leads to a higher probability of selecting squares containing a different number of objects. The proportion of p-value > 0.05 therefore decreases faster than for higher densities, as presented in Figure 3.4(g). For inhomogeneous distribution, the inverse phenomenon is observed : decreasing the objects' density increases the homogeneity index. Indeed, as the object are unevenly spread across the image, a lower density decreases the average difference observed in two squares, irrespective of their size. Therefore, the proportion of p-values > 0.05 decreases for almost every square size (i.e. iteration) when the density decreases, as presented in Figure 3.4(h). As homogeneity is linked to the scale at which we look at an image, the same image's size must be kept for every image included in the comparison. Thus, for real image analysis (e.g., for CS-PRP hybrid or composites), the same optical magnification must be used. However, the resolution of the image is of lesser importance as long as the objects are distinguishable. Indeed, the influence of the resolution has been studied on the 9 images of Figure 3.3 where the objects have a diameter of 6 pixels. When dividing the resolution by 2, the mean index's variation observed is of 2.7% and the max variation observed of 5.6% (results on 10 analysis).

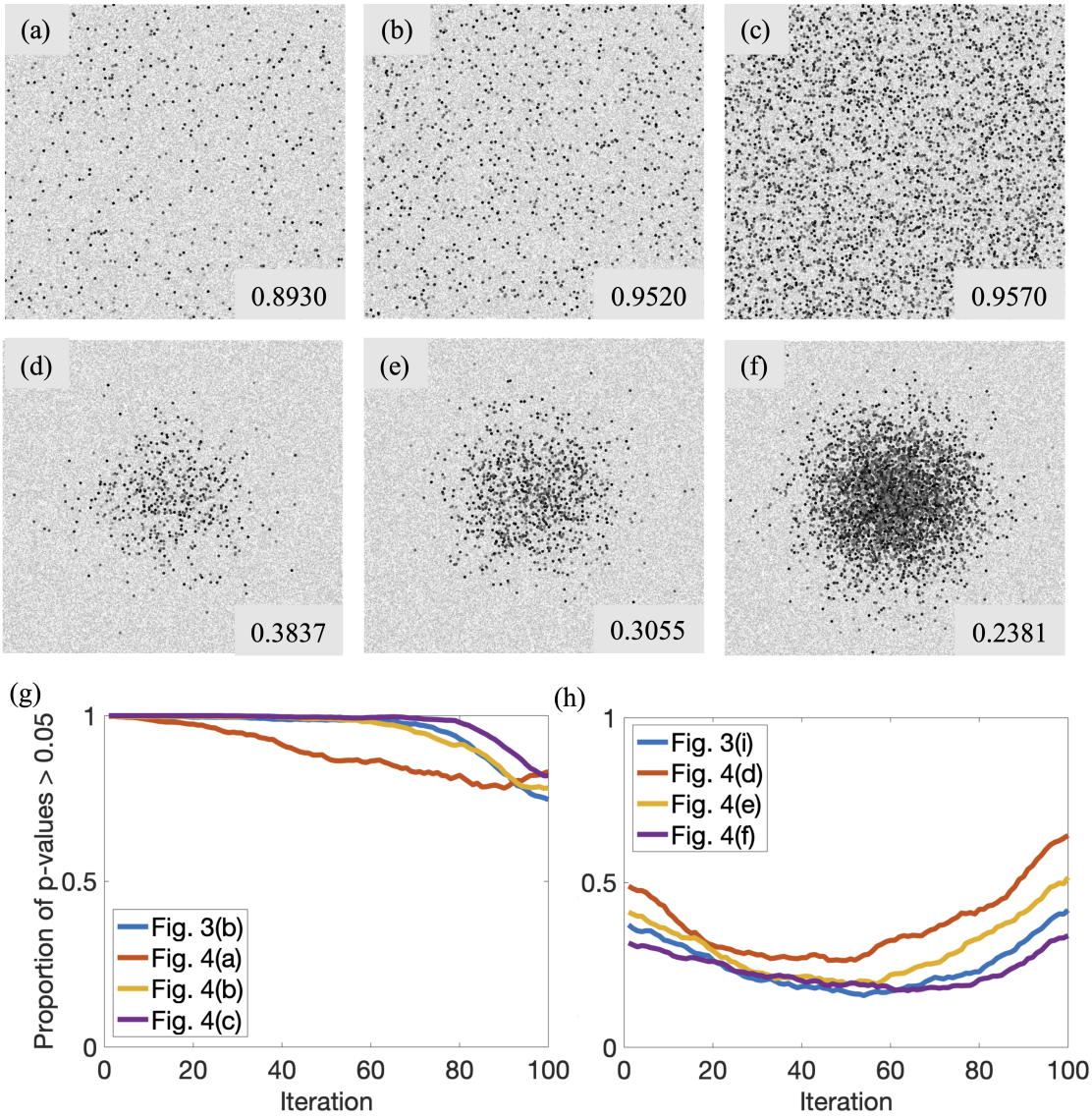


FIGURE 3.4 Varying densities of particles in synthetic images. Background is set as described in Figure 3.3(a) random uniform spatial distribution comprising 512 darker points (4 times less than Figure 3.3(b)) ; (b) random uniform distribution with 1025 darker points (2 times less than Figure 3.3(b)) ; (c) random uniform distribution with 4100 darker points (2 times more than Figure 3.3(i)) ; (d) centered two-dimensional gaussian distribution with 512 darker points (4 times less than Figure 3.3(i)) ; (e) centered two-dimensional gaussian distribution with 1025 darker points (2 times less than Figure 3.3(b)) ; (f) centered two-dimensional gaussian distribution with 4100 darker points (2 times more than Figure 3.3(i)) ; (g) evolution of the proportion of p-values > 0.05 for Figure 3.3(b) and Figure 3.3(a-c) ; (h) evolution of the proportion of p-values > 0.05 for Figure 3.3(i) and Figure 3.3(d-f).

3.6.2 Results for experimental CS-PRP images follows the expert classification and lead to small confidence intervals

The images originate from sections of chitosan/platelet-rich-plasma (CS-PRP) hybrid clot generated through mixing of lyophilized CS and PRP as per Chevrier *et al.* [2] and stained with Cibacron Brilliant Red and Iron-Hematoxylin as described in [211] (Figure 3.5(a) ; more information on this process can be found in supplementary information 1 (Annexe B)). The analyzed CS-PRP images have thus three main components, as shown in Figure 3.5(b) : 1) dark pink stained chitosan aggregates ; 2) light pink stained erythrocytes ; and 3) background. The slides were scanned at 40x optical magnification using a digital slide scanner (Hamamatsu Nanozoomer RS). The analyzed images had a size of 7680x4352 pixels (corresponding to 1750x993 μm) and represented ∼1/15th of the whole CS-PRP hybrid clot section as shown in Figure 3.5(a). To analyze a whole slide, nine images are acquired throughout the tissue section. The obtained images are colored (RGB), hence each pixel is defined by a three-elements vector containing red, green and blue values.

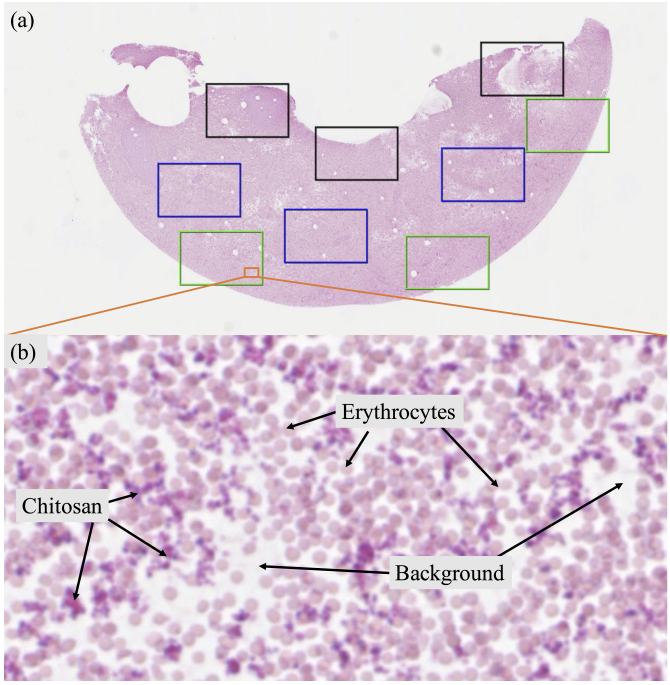


FIGURE 3.5 (a) Obtention of the experimental images from the hybrid clot and generalization of the algorithm to whole slide. Several images are taken through the slide : three on the upper edge (black), three in the middle of the slide (blue), and three on the lower edge (green). (b) Magnified image showing the three main images components : dark pink chitosan, light pink erythrocytes and background.

The expert determines if the chitosan aggregates are homogeneously distributed among the cells by visually analyzing the images. The expert then classifies the images as homogeneous, more or less homogeneous or non-homogeneous. This classification constitutes the ground truth. It is difficult for an expert to classify the images further, such as by ordering them within a class. The test images were classified by the expert, without any prior knowledge of the algorithm results.

The results obtained by MASQH on experimental CS-PRP data is illustrated on the 10 images of Figure 3.6 and compared to the expert classification. As the algorithm is stochastic, results are expressed as a mean of 50 runs of the algorithm on the same image (obtention of 50 index values per image). As previously demonstrated by Equation 3.8, the final index standard deviation theoretically never exceeds 0.0035 for the chosen number of squares and of sizes used in the analysis ($n = 400$ and $k = 100$). Therefore the 95% confidence interval of the index, computed as $\bar{x} \pm 2\sigma$, never exceeds $\bar{x} \pm 0.7\%$, which shows the algorithm's robustness (were $\bar{x}$ is the sample mean and σ the theoretical maximal standard deviation). This confidence interval was experimentally verified over 50 runs for the 10 images of Figure 3.6. Figure 3.7 shows the evolution of p-values > 0.05 for each image. Table 3.2 and Figure 3.8 present the results obtained with MASQH and show that it follows the expert classification : Figure 3.6(a-c) are classified as homogeneous by the expert and have indexes close to 1 (higher than 0.8) ; Figure 3.6(i,j) are classified as inhomogeneous and have indexes close to 0 (smaller than 0.3) ; Figure 3.6(d-h) are classified as more or less homogeneous and have indexes between 0.3 and 0.8.

MASQH therefore follows the expert classification but also analyzes the images further by allowing a quantitative classification (and ranking). Figure 6(d) and (e) shows the same phenomenon observed for synthetic images of Fig. 3(e) and (g) : the clusters observed in Figure 3.6(d) are spread over the whole picture, which is therefore considered more homogeneous than Figure 3.6(e) showing a gradient.

Those results were obtained by extracting the green channel to obtain a gray scale image. The green channel is here chosen as it is the one showing the highest contrast. The minimal square length, l_{min}, was fixed to 100 pixels. This value is based on the observation that, even when they are homogeneously spread, cells tend to aggregate in a random fashion (as observed in Figure 3.5). Using smaller squares could lead to some squares containing cells aggregates and others containing only background, which is inevitably inhomogeneous. This would be a problem as the natural random cell aggregation is not the process under study in our images, as we aim to analyze if the chitosan aggregates are homogeneously distributed among the cells. Using smaller squares would therefore detect inhomogeneities which are

non-significative for this analysis.

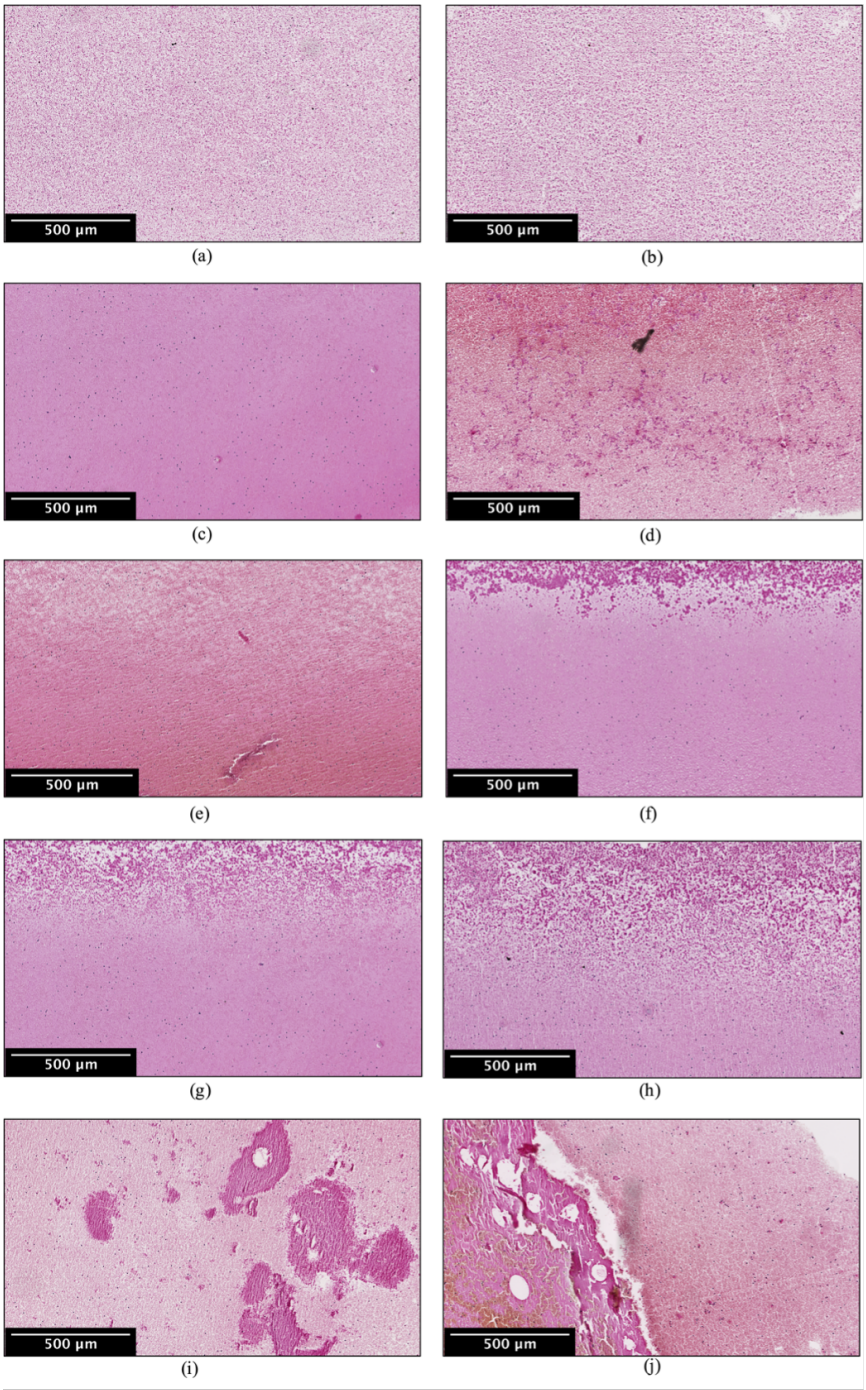


FIGURE 3.6 Histological test images of chitosan (CS) dispersed in a CS-PRP hybrid clot. Erythrocytes are colored light pink and chitosan dark pink. Image (c) was acquired in a zone devoid of polymer. The expert classification is as follows : (a-c) are considered homogeneous ; (d-h) are considered more or less homogeneous ; (i, j) is considered not homogeneous.

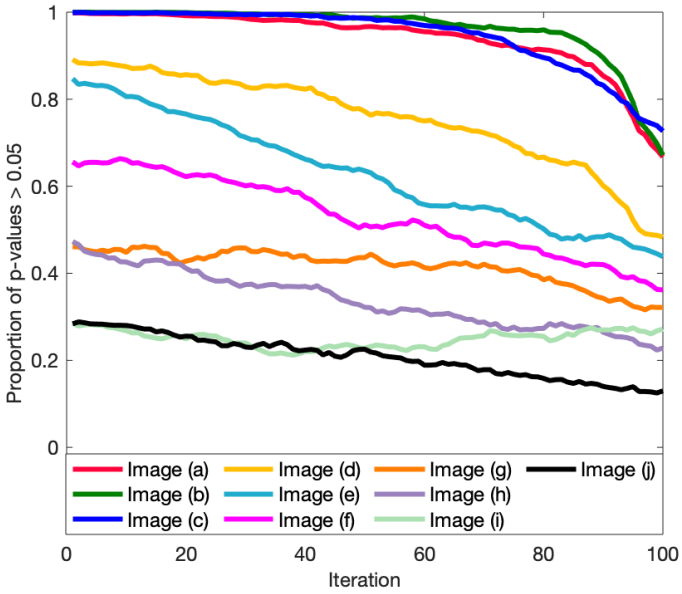


FIGURE 3.7 For each image of Figure 3.6 : proportion of p-value > 0.05 for 100 analysis scales. A moving average over 10 values was performed for clarity purpose.

TABLEAU 3.2 Homogeneity indexes and expert classification

Image	Mean Index [%]	Expert classification
Figure 3.6(a)	93.81	Homogeneous
Figure 3.6(b)	96.00	Homogeneous
Figure 3.6(c)	94.56	Homogeneous
Figure 3.6(d)	75.06	More or less homogeneous
Figure 3.6(e)	62.13	More or less homogeneous
Figure 3.6(f)	52.73	More or less homogeneous
Figure 3.6(g)	41.83	More or less homogeneous
Figure 3.6(h)	33.47	More or less homogeneous
Figure 3.6(i)	24.52	Not homogeneous
Figure 3.6(j)	20.27	Not homogeneous

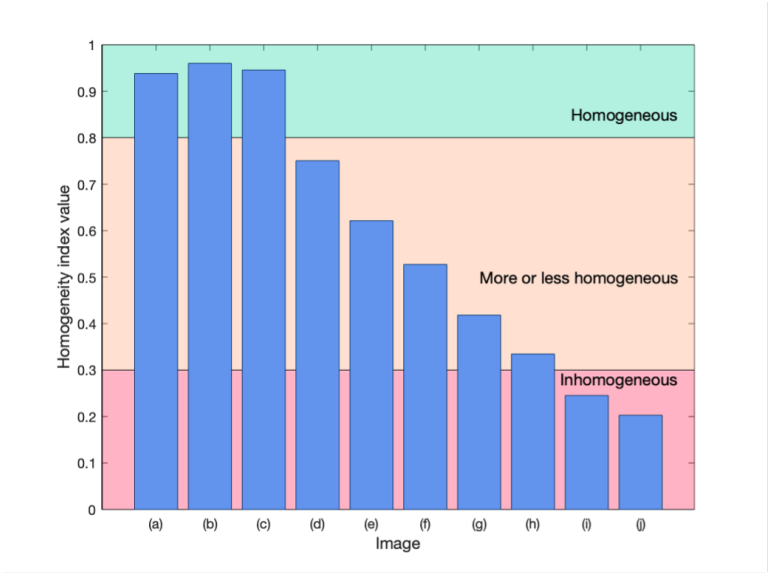


FIGURE 3.8 For each test images of Figure 3.6 : mean indexes obtained for 50 repeated computations. The results follow the expert classification, which is represented in green for homogeneous images, in orange for more or less homogeneous images and in red for inhomogeneous images.

3.6.3 Results for experimental nanaocomposites images show the pertinence of MASQH when compared with two other algorithms

The results of MASQH on nanocomposites images is illustrated for the 3 images of Figure 3.9.

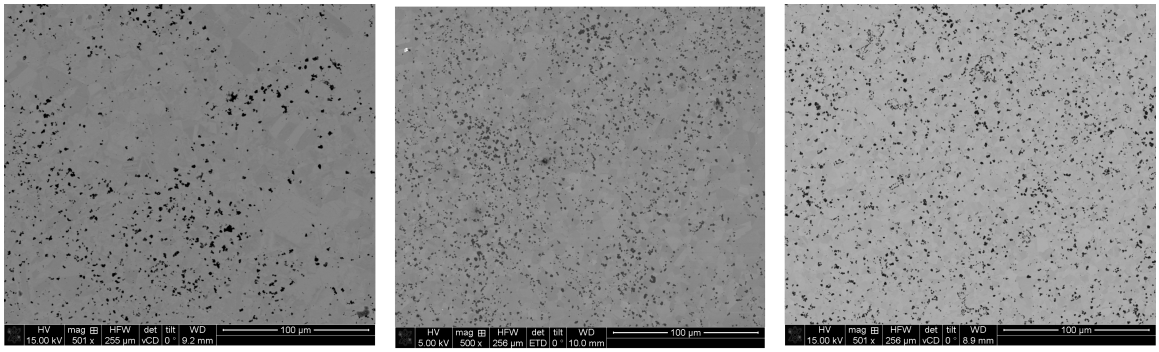


FIGURE 3.9 Test electron micrographs of three nanocomposites samples (from [178] with permission, SEM of (a) MWCNT/Ni 1 wt.%; (b) MWCNT/Ni 2 wt.%; (c) MWCNT/Ni 3 wt.%).

Here, the algorithm was used with $l_{min} =$ 100 pixels. These results are compared to those

reported by Rossi *et al.* [178] (region homogeneity algorithm) and those obtained using the particle-free length algorithm [176] (see Figure 3.10 and Table 3.3). Those two algorithms start with a binarized image. As done in [178], the errors in homogeneity were estimated as the maximal variation obtained in 10 runs of the algorithm. For the region homogeneity algorithm, the reported errors are due only to the binarization process. For the particle-free length algorithm, the binarization was performed manually through a histogram-based thresholding. The same binarization was used for every run. The errors are then due to the stochasticity of the algorithm only, the same as for MASQH where no segmentation is required. Rossi *et al.* found, for the 3 images of Figure 3.9 a correlation between the hardness of the material and its homogeneity : the two parameters seem to be linearly proportional in the reported ranges of hardness/homogeneity. The same correlation is found for particle-free length (negative correlation) and for MASQH (positive correlation), as shown in Figure 3.10. The coefficient of determination of the linear regression (R^2) and the micro-hardness values are shown in Table 3.3. MASQH shows a small index variation (i.e. small error). The slope of the linear model for our algorithm is similar to the one of the region homogeneity algorithm. This comparison shows that MASQH is precise and leads to results similar to those found in the literature, but without the need for segmentation. However, this conclusion could be strengthened if more images were available.

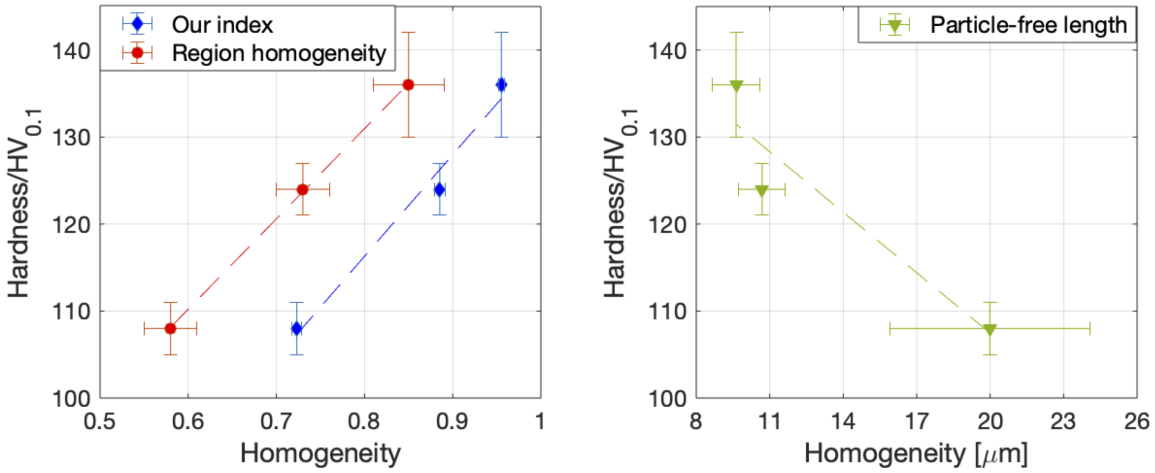


FIGURE 3.10 Homogeneity indexes for the three images of Figure 3.9 versus hardness of the composites. The indexes were obtained using our method (⧫), the region homogeneity index described in [178] (•) and the particle-free length index described in [172] (▼). A linear fitting was applied to the data ($R^2 = 0.979$ for our method, $R^2 = 0.999$ for the region homogeneity index and $R^2 = 0.884$ the particle-free length index). Our method leads to the smallest variation (computed from ten iterations) and the regression coefficient is close to 1.

Tableau 3.3 Microhardness of each image in Figure 3.9. and corresponding homogeneity indexes obtained through MASQH and through region homogeneity and particle-free length algorithm.

Image and R^2	Hardness $[HV_{0.1}]$	Our algorithm	Region homogeneity	Particle-free length
MWCNT/Ni 1 wt.%	108 ± 3	$72 \pm 0.6\%$	$58 \pm 3\%$	$20.0 \pm 4.1\mu m$
MWCNT/Ni 2 wt.%	124 ± 3	$89 \pm 0.6\%$	$73 \pm 3\%$	$10.7 \pm 1.0\mu m$
MWCNT/Ni 3 wt.%	136 ± 3	$96 \pm 0.3\%$	$85 \pm 4\%$	$9.6 \pm 1.0\mu m$
R^2	/	0.979	0.999	0.884

MASQH is also compared to 12 algorithms issued from the literature in Supplementary Information 3 (Annexe D) in terms of their main features, robustness, applicability to images from different instrumentations and fields, drawbacks, nature, and properties of the images tested and dependance on inhomogeneities position. Most of the presented algorithms seems applicable to images from any instrumentation, field or size. However, it should be noted that segmentation is required for seven of those algorithms, which necessarily limits both their robustness and their applicability to other fields or instrumentation. Besides, most of these algorithms would be computationally demanding if applied to large images. Finally, besides from MASQH, the code is available for only one of the compared algorithms.

3.6.4 The MASQH algorithm can be generalized for larger structure analysis

MASQH can be generalized for larger structure analysis. For example, it can be generalized for the analysis of the whole slide presented in Figure 3.5(a) as follows : 1) a sample of 9 images are chosen throughout the whole slide, as shown in Figure 3.5(a). 2) The three first algorithm steps (green channel extraction, random center positioning and random data collection in squares), described in Figure 3.2(b-d), are done separately for the 9 images. 3) The fourth step (Figure 3.2(e)), random square pairing, is done for the 9 images taken together. For example, a square from image 1 could be paired with one from any other image. After step (e), 1800 pairs are therefore obtained (400 squares per images, 9 images) 4) The last steps (Figure 3.2(f-h)) are performed on all the pairs. In the end, a global index is obtained, computed on the 9 images taken together. The same generalization scheme could be used in other fields. A similar scheme could also be used for 3D samples described by several 2D superimposed images.

3.6.5 Additional considerations

Although MASQH is simple, robust and allows a precise classification of various images, it also presents some limitations and drawbacks. Two such drawbacks are intrinsic to the definition given for homogeneity : 1) The size and method of acquisition of the images have to be identical for every image to be compared. 2) As homogeneity is characterized with respect to a property of interest, at least one field-dependent parameter has to be used. In the proposed algorithm, it is the smallest scale of analysis (i.e. smallest square). 3) The homogeneity index issued from an image can only be used as a relative measure if compared to indexes issued from images representing the same subject (i.e. issued from the same field).

Two other limitations arise from the proposed algorithm : 1) The absence of segmentation increases robustness but decreases specificity. For example, if the objects of interest are placed on an inhomogeneous background, the background will decrease the final homogeneity index provided by the algorithm. Higher specificity may be reached if a precise and robust segmentation is available (i.e. if the objects of interest can be separated from the background). 2) As homogeneity is a function of scale, every sub-image compared must have the same size. The squares used in the proposed algorithm must therefore always be completely contained in the analyzed image. Therefore, pixels located in the center of the image have more probability to be contained in a sub-image than pixel situated near the image border. This difference in probability decreases with the size of the analysis square. The same border effect is observed in 4 of the 12 algorithms compared to MASQH in Supplementary Information 3 (Annexe D), which represent all algorithms based on a multi-scale approach.

3.7 Conclusion

We proposed a definition of homogeneity and developed a method called MASQH to quantify it in various images. Our definition states that a grayscale image is homogeneous when it is made of sub-images having identical gray-level cumulative distribution function, which is the first key concept behind our algorithm. The second key concept is to avoid segmentation. This allows our algorithm to overcome some of the limitations that characterize other algorithms, mainly a lack of simplicity and of robustness. As a proof of concept for its versatility, MASQH was applied to a variety of synthetic and experimental images (CS-PRP hybrid clots or nanocomposite), and MASQH has been proven to simply discriminate and classify various images or situations. We believe that this method will be useful in many fields where the notion of homogeneity corresponds to the definition proposed in this manuscript. In that endeavor, a MATLAB™ application and a code performing the described algorithm are freely

available (`https://github.com/Biomaterials-and-Cartilage-Laboratory/MASQH`). The application also guides the user in the choice of the smallest analysis scale.

CHAPITRE 4 ARTICLE 2 : INJECTABLE LYOPHILIZED CHITOSAN-THROMBIN-PLATELET-RICH PLASMA (CS-FIIA-PRP) IMPLANT TO PROMOTE TISSUE REGENERATION : *IN VITRO* AND *EX VIVO* SOLIDIFICATION PROPERTIES.

Authors : Fiona Milano, Anik Chevrier, Gregory De Crescenzo, and Marc Lavertu*

Submission received : 6 June 2023 / Revised : 26 June 2023 / Accepted : 28 June 2023 / Published : 30 June 2023. Polymers 2023, 15(13), 2919 ; https://doi.org/10.3390/polym15132919. (This article belongs to the Special Issue Research Progress on Chitosan Applications)

This research was funded by ChitogenX (research contract), the FRQNT (stipend allocated to F.M. via the PBEEE program, funding number 304445), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (stipend allocated to F.M. via the NSERC-CREATE PrEEmiuM program, funding number 511957-2018).

F. Milano is with the Biomedical Engineering Institute, Polytechnique Montreal. A. Chevrier is with the Chemical Engineering Department, Polytechnique Montreal. G. De Crescenzo and *M. Lavertu are with the Chemical Engineering Department and the Biomedical Engineering Institute, Polytechnique Montreal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada (e-mail : marc.lavertu@polymtl.ca).

Acknowledgement The authors would like to thank Laure Siebierski for TEG data acquisition.

Author Contributions : Conceptualization, F.M., A.C. and M.L. ; Methodology, F.M., A.C. and M.L. Software, F.M. ; Validation, F.M., A.C. and M.L. ; Formal Analysis, F.M. ; Investigation, F.M. ; Resources, M.L. ; Data Curation, F.M. and A.C. ; Writing – Original Draft Preparation, F.M. ; Writing – Review & Editing, A.C., M.L. and G.D.C.. ; Visualization, F.M. ; Supervision, M.L. and G.D.C ; Project Administration, M.L. ; Funding Acquisition, M.L.

Détail de la contribution de F. Milano : Recherche bibliographique ; conceptualisation ; méthodologie ; expérimentation ; analyse des données ; utilisation de logiciels ; validation ; visualisation ; rédaction.

Keywords : chitosan, thrombin, platelet-rich plasma, injectable implant, tissue regeneration, solidification properties

4.1 Abstract

Freeze-dried chitosan formulations solubilized in platelet-rich plasma (PRP) are currently evaluated as injectable implants with the potential for augmenting the standard of care for tissue repair in different orthopedic conditions. The present study aimed to shorten the solidification time of such implants, leading to an easier application and a facilitated solidification in a wet environment, which were direct demands from orthopedic surgeons. The addition of thrombin to the formulation before lyophilization was explored. The challenge was to find a formulation that coagulated fast enough to be applied in a wet environment but not too fast, which would make handling/injection difficult. Four thrombin concentrations were analyzed (0.0, 0.25, 0.5, and 1.0 NIH/mL) *in vitro* (using thromboelastography, rheology, indentation, syringe injectability, and thrombin activity tests) as well as *ex vivo* (by assessing the implant's adherence to tendon tissue in a wet environment). The biomaterial containing 0.5 NIH/mL of thrombin significantly increased the coagulation speed while being easy to handle up to 6 min after solubilization. Furthermore, the adherence of the biomaterial to tendon tissues was impacted by the biomaterial-tendon contact duration and increased faster when thrombin was present. These results suggest that our biomaterial has great potential for use in regenerative medicine applications.

4.2 Introduction

Our laboratory developed a freeze-dried (FD) formulation of chitosan (CS) intended to be solubilized in platelet-rich plasma (PRP) to form injectable implants that coagulate in situ [2]. This biomaterial is intended to be used as a surgical adjuvant in diverse applications in orthopedic regenerative medicine.

Chitosan (CS) is a cationic linear polymer consisting of monomers of N-acetyl glucosamine and glucosamine monomers, which is usually obtained through alkaline deacetylation of chitin [3]. CS has been found to exhibit a greater affinity for cells and growth factors than other natural polymers, most likely because of its ability to mediate attractive electrostatic interactions [8]. CS is biodegradable and biocompatible [3, 4, 8], and it has numerous application in the biomedical field [5]. These applications include drug delivery, gene therapy, vaccines, tissue engineering [6] and wound healing [7]. CS interesting properties in wound healing includes its antimicrobial, hemostatic and analgesic character [9]. Moreover, CS influences the coagulation cascade by mediating hemagglutination and by promoting platelet activity [6]. CS molecular weight and degree of deacetylation (DDA, the fraction of glucosamine monomers) impact the innate immune responses [6], and chitosan is considered an excellent candidate as

a mucosal adjuvant [212]. Overall, the unique properties of CS make it an attractive polymer for a variety of biomedical applications.

PRP is a plasma fraction containing a platelet concentration several times higher than whole blood (WB) [11]. Upon activation, these platelets release several growth factors [12] which are believed to promote tissue repair by inducing cell proliferation, cell differentiation, and angiogenesis at the injury site [13]. However, the literature on the efficacy of PRP in improving tissue repair has yielded inconsistent results, and there is currently insufficient clinical evidence to support its use [15]. These inconsistencies may arise from the lack of standardization of platelet separation techniques, the variability in formulations of PRP used, as well as from the poor stability and residency of PRP *in vivo* [15, 16].

Using PRP instead of WB to rehydrate FD CS formulations is expected to enhance the bioactivity of resulting hybrid implants and improve tissue repair outcomes [2]. Our previous research has demonstrated that CS increases the release of platelet-derived growth factor, prolongs the residence time, and enhances the bioactivity of PRP *in vivo*, while inhibiting the platelet-mediated clot retraction observed with the use of PRP alone [213]. Animal studies have confirmed that CS-PRP implants are biodegradable, biocompatible, and effective in augmenting rotator cuff, cartilage, and meniscus repair (increase cell recruitment, vascularization, remodeling, and tissue repair) in both small and large animal models [16, 17, 214]. Moreover, CS-PRP implants possess important characteristics for soft tissue repair, such as injectability, stickiness and paste-like handling properties, and the ability to solidify in situ.

However, mixing FD CS with PRP results in a hybrid clot implant which solidifies slowly, especially for human PRP. When applied directly after mixing, the wound/defect's wet environment can hinder the biomaterial from adhering to the site of injection. In an ongoing rotator cuff multicenter, prospective, randomized clinical trial (ClinicalTrials.gov, NCT number NCT05333211, Sponsor : ChitogenX Inc.), the biomaterial is required to be incubated in a syringe for 30-45 minutes before reaching a viscosity suitable for injection at the repaired site. A more rapid and controlled implant solidification would facilitate its handling, its administration, and ultimately its clinical implementation.

The objective of this study was to develop a novel formulation of FD CS with accelerated solidification. We hypothesized that the solidification of CS-PRP implants can be accelerated by incorporating thrombin (FIIa), as previously reported for CS-glycerol phosphate/blood implants [105]. Our selection of this coagulation factor was based on its well-known ability to promote the repair process, as well as its established use in other clinical contexts [215, 216]. A second hypothesis was that thrombin could be added prior to FD to create a stable CS-FIIa lyophilized formulation. Adding thrombin prior to FD 1) ensures that thrombin is evenly dis-

persed in the biomaterial upon rehydration in PRP, and 2) simplifies the procedure compared to in situ mixing of the CS-PRP implant with a thrombin formulation/solution. However, this approach presents a challenge : the formulation should coagulate fast enough to be applied in a wet environment upon mixing, but not so quickly that it becomes difficult, if not impossible, to handle/inject. To achieve this balance, CS-PRP biomaterials containing thrombin concentrations of up to 1.0 NIH/mL were studied *in vitro* (using thromboelastography, rheology, indentation, syringe injectability and thrombin activity tests) as well as *ex vivo* (by assessing the implant's adherence to tendon tissue in a wet environment).

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Preparation of freeze-dried chitosan formulations

The FD CS formulations preparation were based on the method developed by Chevrier *et al.* 2018 [2]. Raw chitosan (Primex, Product N°43030) underwent a heterogeneous alkaline deacetylation to reach a DDA of 82 ± 2 % (mean value $\pm SD$ for 3 batches, measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy [217]). It was then depolymerized with nitrous acid to reach a molar mass (M_n) of 39.3 ± 0.4 kDa (mean value $\pm SD$for 3 batches, measured by size-exclusion chromatography/multi-angle laser light scattering [218]). CS was dissolved in HCl overnight, at room temperature, to obtain a solution containing 1% (w/v) CS. The concentration of this HCl solution was adjusted to reach 60% protonation of the CS amino groups. Calcium chloride (Sigma, Product N°C-5670) was added as a solidifying agent to reach a final concentration of 42.2 mM, then trehalose (Sigma, Product N° T-0167) was added as a lyoprotectant to reach a final 1% (w/v) content. The resulting solution was passed through $0.45\mu m$ filters and dispensed in glass vials. pH of the chitosan solutions was 6.35 ± 0.16 and osmolality was 199 ± 21 (mean value ± SD for 9 batches).

For formulations containing thrombin, thrombin diluted in a 0.1% (w/v) BSA solution was added to each glass vial to reach a thrombin activity of 0.25 NIH/mL, 0.50 NIH/mL or 1.0 NIH/mL and a final BSA concentration of 0.01% (w/v). All vials were then freeze-dried through the following cycle using a Millrock freeze-dryer (Laboratory series LD85S3) : 1) step freezing (to 20 °C then isothermal for 15 min, to 5°C then isothermal for 30 min, to -5 °C then isothermal for 30 min) then ramp freezing to -40°C at -1°C/min, then isothermal for 2h ; 2) ramp heating at 0.5°C/min up to 8°C at 76 mTorr, then isothermal for 650 min ; 3) ramp heating at 0.15°C/min until 40°C at 76 mTorr, then isothermal for 6h. A less aggressive cycle was initially used, heating up to only 25°C during step 3 (secondary drying), but for 10 hours. However, no differences were observed in the resulting FD CS formulations (data not

shown), and the cycle heating up to 40°C was preferred for the rest of the study. Of note, some of the data used in Figure 4.1 (thromboelastography results) were obtained from the less aggressive FD cycle.

4.3.2 Isolation of platelet-rich-plasma

Commercial sterile citrated sheep blood (Cedarlane, Product N°CL2581-500C) was used to isolate the leucocyte-rich PRP. Briefly, whole blood was distributed in 10 mL aliquots in 15 mL Falcon tubes, then centrifuged at 800 g for 20 minutes (unforced deceleration). The supernatant, buffy coat and first 1-2mm of erythrocytes were collected in new 15 mL Falcon tubes, and a second centrifugation was then performed at 600 g for 10 minutes (unforced deceleration).

4.3.3 Rehydration of the CS FD formulation

Freeze-dried CS cakes were solubilized in PRP by a vigorous manual shaking for 30 seconds. The cakes were made from various volumes of CS solutions, depending on the final amount of biomaterial needed (1 mL, 3 mL, 5 mL, 6 mL or 8 mL), and rehydrated in the same volume of PRP.

4.3.4 Assessment of clotting properties of CS-PRP formulations by thromboelastography

After dissolution of the CS cakes in PRP, 360 μL of each formulation was immediately loaded in a thromboelastograph (TEG) cup, using a 1 mL syringe and an 18G needle (allowing viscous formulation to be easily retrieved from the vial). TEG tracings were recorded during 1h and three parameters were used to compare the samples : 1) The clot reaction time, R, which is the time in minutes to reach a 2 mm divergence between the two branches of the TEG curve and is indicative of the time needed for the coagulation process to start. 2) The maximal amplitude, MA, which is the maximal distance reached between the two branches of the TEG curve (in mm) and is indicative of the clot strength. 3) The K-value, which is the duration between R and the time when a 20 mm divergence between the two branches of the TEG curve is reached and is indicative of the coagulation speed. Two PRP solutions were used as controls. The first consisted of PRP recalcified in 42.2 mM of calcium chloride. The second consisted of PRP recalcified in 42.2 mM of calcium chloride and 0.5 NIH/mL of thrombin. A TEG Model 5000 (Haemoscope Corp) was used for all samples.

4.3.5 Assessment of clotting properties of CS-PRP formulations through rheology measurements

Clotting properties were measured using a Physica MCR 501 rheometer (Anton Paar, Graz, Austria). Concentric cylinders with rough geometry were used for measurements (CC17/T200/SS/p, cup diameter of 18.08 mm and bob diameter of 16.66 mm). After mixing the CS FD formulation (8 mL) with PRP, 5 mL of the formulation was placed in the cup. Rheological properties were measured during a time sweep over the course of either 1 hour or 15 minutes, at a fixed 1% strain and a fixed 5 rad/s frequency. The choice of these parameters is explained and justified in Annexe E. All measurements were performed at 37°C.

4.3.6 Assessment of the force required to eject the biomaterial

The protocol used was implemented on the multi-axis mechanical tester Mach-1, Model V500css (Biomomentum Inc, Laval, Qc, Canada) with a 25 kg uniaxial load cell and a flat circular indenter with a diameter of 30 mm. 6 mL of each sample were placed in a 10 mL syringe with an 18G x 3.50IN quincke spinal needle (BD Product N°405184) right after rehydration of the FD-CS formulation in PRP. The syringe was then fixed vertically below the indenter through a custom system (not shown). Starting right after syringe's fixation, 0.5 mL of the biomaterial was pushed every 2 minutes, 10 times, at a speed of 1 mm/s (resulting in 3 seconds movement). Force data were saved at a frequency of 100 Hz for the whole duration of the test.

4.3.7 Assessment of hybrid clot mechanical properties through indentation

The indentation protocol used was implemented on the multi-axis mechanical tester Mach-1, Model V500css (Biomomentum Inc, Laval, Qc, Canada) with a 150 g uniaxial load cell and a spherical indenter with a radius of 1.5 mm (<25% of the sample height - $\sim 8mm$ in our case -, as previously recommended in the literature [219, 220]). 0.3 mL of each sample was placed in a 96-well microplate and allowed to coagulate for 24h at room temperature. The bottom of the microplate was first probed in three empty wells to fit a plane and compute the position of the bottom in each well. For each sample, the surface of the biomaterial was then found by lowering the probe at a speed of 0.05 mm/s until a force of 0.1 gf was detected. A single indentation of 0.7 mm (< 10% of total sample height, as previously recommended in the literature [220, 221] to prevent the influence of the sample height) was then performed at a velocity of 0.07 mm/s. Force data were saved at a frequency of 100 Hz during the indentation

and the relaxation which followed, until the relaxation rate reached 1 gf/min (slope measured for 10 seconds). Samples stiffness and force at equilibrium were computed for each sample.

4.3.8 Assessment of hybrid clot homogeneity through histology and MASQH algorithm

After rehydration of CS FD cakes in PRP, the formulations were placed in glass test tubes (250 μL) at 37°C and solidified for 1 hour. The resulting clots were fixed in 10% neutral buffered formalin (NBF) before being dehydrated, cleared and paraffin embedded. They were then sectioned in 5 μm thick slices, dewaxed and stained. Cibacron Brilliant Red (Glentham life sciences, Product N°GT9393) and Iron-Hematoxylin (Sigma, Products N°HT107 and N°HT109) were used to color chitosan, red and white blood cells, as per the protocol described in Rossomacha *et al.* [211]. The colored sliced were digitally scanned (Hamamatsu Nanozoomer RS) at 10X and 40X. The homogeneity of the chitosan distribution in the hybrid clot was evaluated using the MASQH algorithm [19].

4.3.9 Assessment of CS-PRP formulations adhesion to tendon tissues using an *ex vivo* test

The objective of this test was to determine whether the biomaterial can adhere to wet tissues. *Ex vivo* evaluation of the CS-PRP formulations adhesion to tendon tissues was performed using bovine tendons obtained from a local butcher shop. Prior to testing, tendons were defrosted and heated to 37°C in a 0.9% NaCl bath, a frequently used fluid during shoulder arthroscopic surgeries [222]. Right after mixing of a CS FD cake with PRP, the formulation was retrieved from its vial with a 10 mL syringe and an 18G needle (Sigma, Product N°305180), and a waiting time varying between 0 and 7 minutes was observed to mimic the time taken by the surgeon between mixing the biomaterial and its use. Next, 3 mL of the biomaterial was delivered on the tendon and a second waiting time varying between 0 and 7 minutes was observed. During the surgery, after suturing the tendon to the bone the irrigation fluid is stopped, then the surgical site is dried with a combination of fluid aspiration and sterile cotton swabs. The biomaterial is then delivered at the tendon-bone interface and on the tendon before closing the articulation. The second waiting time therefore mimics the conditions after the biomaterial application and the end of the surgery, as the physiological fluid does not return instantly in the articulation. After this second waiting time, the tendon and adhered biomaterial were submerged in a 1 L 0.9% NaCl bath and twisted in the fluid for 1 minute to simulate the presence of physiological fluids and movement of the shoulder. The quantity of biomaterial remaining on the tendon was then visually observed (qualitative

evaluation). The color of the 0.9% NaCl bath was quantitatively evaluated through image analysis : a photograph of the bath was taken and the weight of its red channel was computed using the ImageJ software [223].

4.3.10 Assessment of thrombin activity in freeze-dried chitosan formulations

The activity of thrombin in the CS formulations was quantified before FD and in CS FD cakes using a fluorometric thrombin activity assay kit (Abcam, ab197006). FD samples were rehydrated in water instead of PRP. All samples were diluted at 1/2 and 1/5 in assay buffer. As per Abcam protocol, 6 standards were used to construct a standard curve, with concentrations ranging from 0.26 NIH/mL to 1.3 NIH/mL. Fluorescence was measured at Ex/Em = 350/450 at 37°C in a kinetic mode every 2 minutes for 60 minutes using an Infinite M200 reader (Tecan Trading AG, Switzerland).

4.3.11 Statistical analysis

To investigate whether thrombin accelerates coagulation significantly, the TEG results were subjected to statistical analysis using the Mann-Whitney U test. Similarly, the same test was performed on the TEG results to determine if there was any alteration in the biomaterial activity due to the storage time. Differences were considered significant for p-values < 0.05. The figure's caption accompanying each result contains information on the number of independent experiments conducted (N) as well as the number of replicates for each sample in these experiments (n).

4.4 Results and discussion

4.4.1 Chitosan freeze-dried with thrombin easily solubilises in PRP, exhibits thrombin activity, and maintains stability for at least 2 months at room temperature.

Freeze-dried chitosan formulations (Figure 4.1.(a) were slightly retracted from the vial walls for all thrombin concentrations (this phenomenon was expected, and previously observed by our research group [87]). They rapidly solubilized in PRP without any apparent influence of the thrombin concentration.

pH of whole blood was of 7.69 ± 0.13 and pH of PRP was of 7.97 ± 0.18 (mean value $\pm$ SD for 12 batches). Osmolality of whole blood was 316 ± 3 and osmolality of PRP was 317 ± 2 (mean value $\pm$ SD for 8 batches). pH of the CS-PRP formulation, with or without thrombin,

was 7.20 ± 0.16 (mean value $\pm$ SD for 15 batches).

An activity loss of $\sim 20 - 25\%$ was observed after lyophilization for samples containing 0.5 NIH/mL of thrombin, which was the only formulation assessed using the thrombin activity kit. In the remainder of the manuscript, the thrombin activity mentioned will refer to the activity before lyophilization (i.e., not taking into account the $\sim 25\%$ activity loss). The 0.5 NIH/mL formulation was also tested for thrombin activity with and without CS before freeze-drying and no difference was observed. This suggests that the interaction between thrombin and CS is weak or nonexistent, as previously reported in [224, 225]. This expected result is likely due to the cationic character of chitosan and thrombin at the pH of the solution. The histology of CS-FIIa-PRP implants confirmed that CS was evenly distributed among blood components in the presence of thrombin. A MASQH homogeneity score of 0.92 ± 0.03 was computed for CS-PRP implants and of 0.93 ± 0.02 for CS-FIIa-PRP implants (mean value $\pm$ SD for 5 samples in each case).

A stability study was conducted for a period of two months and thrombin activity was assessed at three specific time-points (t = 0, 28, and 56 days) using TEG. All the samples were stored at room temperature (RT). Some FDA-approved biomaterials containing thrombin were stored at temperature below -18°C (they contain solubilized human thrombin for topical use, e.g. Evithrom®, Tisseel®and Evicel®pre-filled syringe) and others were stored at RT (they contain lyophilized human thrombin powder, e.g. Recothrom®, and Tisseel®kit).

This study investigated the stability of biomaterials without thrombin (controls) and of biomaterials containing 0.5 NIH/mL of thrombin. Additionally, freshly extracted PRP controls without thrombin or with 0.5 NIH/mL of thrombin were also included. Examples of typical TEG curves are presented in Figure 4.1(b) for biomaterial samples and in Figure 4.1(c) for PRP samples. No other thrombin concentration was tested as 0.5 NIH/mL was previously identified as the preferred concentration (this choice is justified in section 3.2 below). The results showed that thrombin had a statistically significant impact on the biomaterial's clot reaction time compared to biomaterial without thrombin (control) over a period of up to 56 days (p-value < 0.01 for t = 0 and t = 2 months and p-value < 0.05 for t = 1month, as shown in Figure 4.1(d). The average clot reaction time (R) for control biomaterial was 4.04 minutes, while biomaterial with 0.5 NIH/mL of thrombin had an average R of 3.02 minutes over the three time-points. No significant differences in clot reaction time were observed between control samples at each time-point, which was expected as the biomaterial is already known to be stable for at least three years (unpublished data). Furthermore, no significant differences in clot reaction time were observed between samples with thrombin at each time-point, suggesting that no activity loss occurred during this 2-month period. No

statistically significant differences were observed for the K-value between samples with and without thrombin for all three time-points (Figure 4.1(e). Significant differences were however observed between samples with thrombin after two months and both samples observed at time 0 (p-value < 0.05). This could be explained by the small sample size (N=2 and n=3) for the two-month samples. Further studies are needed to confirm the observed trend. K had a mean duration of 3.45 minutes for control samples and 3.11 minutes for samples with 0.5 NIH/mL of thrombin across the three time points. Notably, MA had a consistent value of approximately 67 mm at all time-points irrespective of the thrombin concentration. This indicates that the addition of thrombin did not affect the strength of the final clot (no significant differences observed, as shown in Figure 4.1(f), as expected.

Compared to PRP controls, biomaterial samples (with or without thrombin) had a smaller R, a smaller K and a larger MA (p-value < 0.01). These findings are consistent with previous research conducted by Chevrier *et al.* [2], who also demonstrated that the addition of CS to blood samples enhanced clot strength and led to faster clot initiation. Furthermore, the addition of thrombin to PRP resulted in a significant decrease in clot reaction time but did not have a significant impact on K and MA.

Long-term stability studies at -20°C, 4°C and RT using thrombin activity quantification kits are ongoing.

Visual observation of the samples coagulation in plastic weighing boats confirmed that the coagulation process is faster when thrombin is present. Although the difference in coagulation time may appear moderate when examining the TEG results, it is significant when the handling properties of the samples are assessed. Supplementary information S1 (Annexe F) includes videos demonstrating this phenomenon.

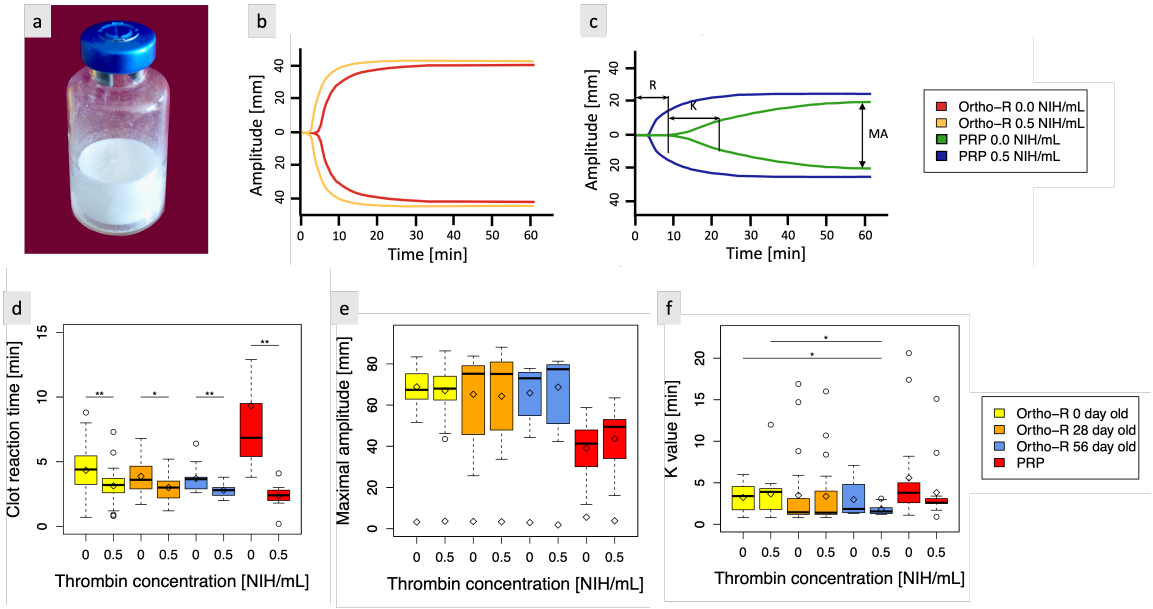


FIGURE 4.1 (a) The biomaterial, which is a lyophilized formulation of chitosan, is designed to be mixed with platelet-rich plasma (PRP) to create a hybrid biomaterial that coagulates in situ. To ensure rapid coagulation in situ during arthroscopic surgery, thrombin was added to the existing formulation. (b) Typical thromboelastograph curves obtained for biomaterial with and without thrombin. (c) Typical thromboelastograph curves obtained for PRP with and without thrombin. (d) clot reaction time (R) (time needed to reach an amplitude of 2 mm), (e) clot maximal amplitude (MA) (indicative of clot strength), (f) K value (time needed after R to reach an amplitude of 20 mm). * indicates a p-value < 0.05 and ** indicates a p-value < 0.01, $\Diamond$ indicates the mean value. Note that statistically significant differences were also observed for the R values between samples with and without thrombin issued from different timepoints but are not indicated on the figure for clarity sake. For the biomaterial with and without thrombin at t=0, N=7 and n=3, at t=1 month, N=6 and n=3 and at t=2 months, N=2 and n=3. For PRP controls with and without thrombin, N=6 and n=2.

4.4.2 Biomaterial containing 0.5 NIH/mL of thrombin is easily dispensed through an 18-gauge needle and 10cc-syringe up to 6 minutes after rehydration of the lyophilized formulation in PRP

For every thrombin concentration, the force needed to eject the biomaterial out of a 10-cc syringe equipped with an 18-gauge needle increases over time, as expected since the coagulation process is ongoing in the syringe. After a few minutes (sooner for higher thrombin concentrations), the force required to eject the biomaterial reaches a maximum, before dropping and/or stabilizing around 25N.

We believe that this drop occurs when the applied force breaks the clot's structure being formed (around 30-40 N in average, but reached values as high as 70-95N, as shown on Figure

4.2). Once the structure is broken, the biomaterial becomes easier to eject but the coagulation process is likely impaired, resulting in altered mechanical properties (as previously observed for PRP after a stress [226] or for fibrin after a stretch or a biaxial confinement [227, 228]).

Even before reaching this maximal force, the high force required to eject the biomaterial might not allow the surgeon to perform precise movements, preventing him to precisely deliver/inject the biomaterial as expected. Indeed, a study by R. Watt *et al.* recommends targeting no more than 20 N of injection force to guarantee an easy expulsion of syringe contents [229]. A force exceeding 20 N was observed as early as the 8th minute for controls and sample with 0.25 NIH/mL of thrombin, on the 6th minute for samples with 0.5 NIH/mL of thrombin, and between the 4th and 5th minutes for samples with 1.0 NIH/mL of thrombin, as shown in Figure 4.2. Based on this analysis, the 0.5 NIH/mL sample was identified as the most promising as it allows a significant increase in coagulation rate while preserving adequate handling properties for at least 6 minutes, providing enough time for the surgeon to use/deliver the biomaterial after its reconstitution.

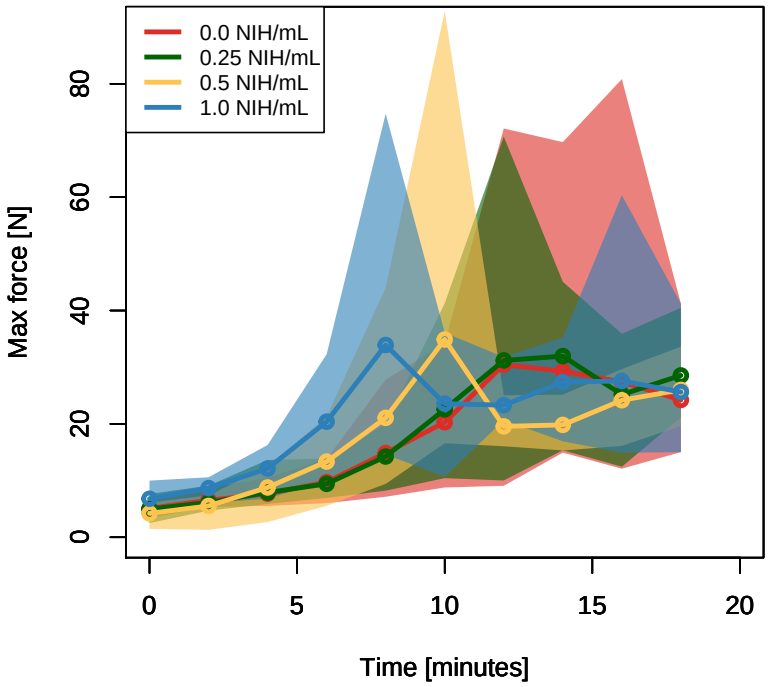


FIGURE 4.2 Force (lines indicate mean values and envelopes indicate min and max values) necessary to push 500 μL of the biomaterial out of a 10cc-syringe equipped with a spinal 18-gauge needle every two minutes, 20 times (N=6 and n=2). The 0.5 NIH/mL solution allows for easy ejection of the biomaterial as the force required for biomaterial ejection remains below 20N for at least 6 minutes. This makes it easier to manipulate than the 1.0 NIH/mL solution, for which a force exceeding 20 N is needed for biomaterial ejection after 4-5 minutes.

4.4.3 Rheometry reveals that thrombin concentration has a significant impact on storage and loss modulus, as well as on the time to gelation point

Biomaterial samples containing 0, 0.25, 0.5 and 1.0 NIH/mL of thrombin were studied through rheometry. The raw results for storage (G') and loss (G") modulus are presented in Figure 4.3(a). It was observed that after 60 minutes, values for G' and G" were not yet stabilized (Figure 4.3(a) has a semi-logarithmic scale), indicating that coagulation process has not been completed for any of the samples.

The gelation point (cross-over between G' and G") occurred in average at 4.15 minutes after rehydration of FD samples in PRP for the controls and after 2.40, 1.03 and 0.35 minutes for the formulation containing respectively 0.25, 0.5 and 1.0 NIH/mL of thrombin. Of note, for 0.5 NIH/mL and 1.0 NIH/mL, this gelation point occurred before the start of the test as it took about 75 seconds to start the rheology experiment after rehydration of the FD samples in PRP. The mixture was therefore already in a viscous solid state (G' > G") when the test was started. The time to gelation for these formulations was determined by extrapolating the raw data (G' and G" as a function of time) as shown in Figure 4.3(b). For the fit, an exponential function of the form $y = A + Be^{Rt}$ was used over the first 3 minutes of the test, where $R \geq 0$, y is either the loss or the storage modulus and t is the time.

The time to gelation decreased significantly with thrombin concentration and followed a negative exponential, as shown in Figure 4.3(c). For example, a thrombin concentration of 0.5 NIH/mL allowed for a reduction of the time to gelation point by a factor of 4 compared to samples without thrombin, with a time of 1.03 minute versus 4.14 minutes). Furthermore, the negative exponential extrapolation of the data suggests that increasing the thrombin concentration beyond 1.0 NIH/mL would bring only a limited decrease in the time to gelation point.

Due to the visco-elastic nature of the samples, there is a time lag observed between the movement of the rheometer and the response signal. This time lag, δ, was calculated using the formula $\tan^{-1}(G''/G')$. A δ value closer to 90° indicates a mainly viscous behavior, as seen in the formulation containing 0 and 0.25 NIH/mL of thrombin at the beginning of the test. Conversely, a δ value closer to 0° indicates a mainly elastic behavior. When modeled as a negative exponential, δ reached a constant value of approximately 4.5° for all thrombin concentrations used, as shown in Figure 4.3(d). This indicates that the coagulated material was in an elastic solid state, as expected. Thrombin-containing biomaterials reached this near-equilibrium faster than controls.

To model the relationship between thrombin concentration and each modulus at a given time,

a model of the form $y = A - Be^{Rx}$, where $R \leq 0$ and x is the thrombin concentration was empirically chosen. A represents the maximal modulus value at a given time (asymptotic value obtained with an infinite thrombin concentration), $A - B$ is the modulus value at a given time when no thrombin is added to the biomaterial (as thrombin is naturally present in blood, the biomaterial is still able to coagulate, so $(A - B) > 0$ and increases with time).

Here the values of G' and G" characterizes the coagulation "state". Within the first 5 minutes of coagulation, increasing thrombin concentration had an almost linear impact on the coagulation state at a given time, as observed in Figure 4.3(e) for G' and in Figure 4.3(f) for G". However, after 5 minutes, the effect of increasing thrombin concentration on the coagulation state saturated for high thrombin concentrations. Based on the chosen exponential model, after 5 minutes, the 0.5 NIH/mL sample already reached 40% of the maximal G' value and 76% of the maximal G" value, where the maximal values were extrapolated using an infinite thrombin concentration. In comparison, after 5 minutes, the control only reached 5% of the maximal G' value and 25% of the maximal G" value, while the 1.0 NIH/mL samples reached 63% of the maximal G' value and 93% of the maximal G" value. All these percentages increased with time, as expected. It should be noted here that the 0.5 NIH/mL samples allowed a significant increase in G' and G" compared to controls and 0.25 NIH/mL samples, while still being easy to manipulate, as discussed in section 3.2. In contrast, the 1.0 NIH/mL samples allowed an even more significant increase in storage and loss modulus but are less easy to manipulate. Using the exponential model, the percentages of maximal G' or G" values reached after 5, 7 and 10 minutes for all thrombin concentrations tested are presented in Table 4.1.

Tableau 4.1 Percentage of maximal G' or G" value reached after a given time, for a given thrombin concentration

Time	0.0 NIH/mL		0.25 NIH/mL		0.5 NIH/mL		1.0 NIH/mL	
	G'	G"	G'	G"	G'	G"	G'	G"
5	5%	25%	25%	58%	40%	76%	63%	93%
7	10%	30%	41%	67%	61%	85%	83%	97%
10	18%	37%	54%	75%	74%	90%	92%	98%

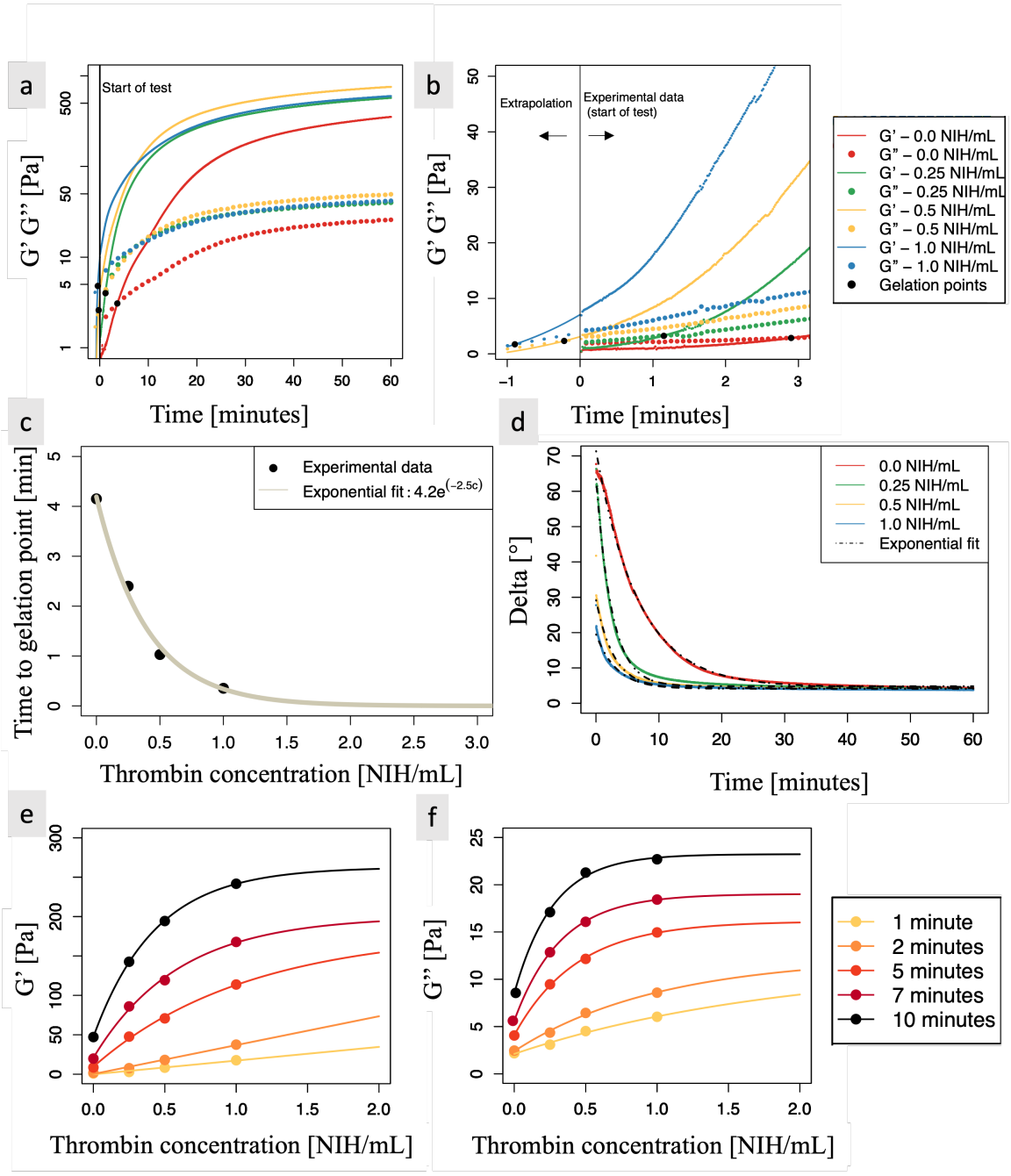


FIGURE 4.3 Rheological results. a) Vertical black line indicates the beginning of the test (t=0 minutes). On the right of this vertical line : Time sweeps mean raw data for storage (G', full lines) and loss (G", dotted lines) modulus of biomaterial with thrombin (0.0, 0.25, 0.5, 1.0 NIH/ml) for a displacement of 1% and a frequency of 5 rad/sec. On the left of the vertical black line : data were extrapolated based on the first 3 minutes of the test for thrombin concentration of 0.5 and 1.0 NIH/mL to determine their gelation point. The equation $y = A + Be^{Rt}$ was used for the fit, where $R \geq 0$, y is either the loss or the storage modulus and t is the time. Black dots : gelation point (G'=G") for each thrombin concentration. b) Zoom for t = -1 to 3 minutes. c) Black dots show the time needed to reach

gelation point for biomaterials with each thrombin concentration (0.0, 0.25, 0.5, 1.0 NIH/ml). In order to account for the time elapsed between the rehydration of the biomaterial and the start of the test, 1.25 minutes were added to the experimental time observed in panel b. The experimental data were fitted using the equation $y = Ae^{Rx}$, where $R \leq 0$ (solid curves), y is the time to gelation and x is the thrombin concentration. d) Results of phase angle ($\delta°$) for biomaterials (0.0, 0.25, 0.5 or 1.0 NIH/ml of thrombin) over 60 minutes. $\delta = \tan^{-1}(G"/G\prime)$. The experimental data was fitted using the equation $\delta = A + Be^{Rx}$, where $R \leq 0$ (solid curves), and x is the thrombin concentration. e) Values of G' (Pa) and f) values of G" (Pa) for biomaterials with or without thrombin (0.0, 0.25, 0.5, 1.0 NIH/ml) at 1, 2, 5, 7 and 10 minutes (• are experimental data). The values of G' and G" (Pa) at those times were empirically fitted with the equation $y = A - Be^{Rx}$, where $R \leq 0$ (solid curves), and x is the thrombin concentration. For results presented in a) and d), N=2 and n=2. For results presented in b), c), e) and f), N=5 and n=2.

4.4.4 Indentation experiments indicate that there is no significant difference in stiffness and equilibrium force between the coagulated biomaterials containing thrombin and the control samples.

Despite its ability to increase the speed of the coagulation process, additional thrombin does not seem to have a significant impact on the mechanical properties of the fully coagulated clot, as the force at equilibrium and stiffness were stable regardless of the thrombin concentration tested, and no correlation was observed between either of them and thrombin concentration. The average stiffness varied only slightly from 3.7 gf/mm (material with 0.5 NIH/mL of thrombin) to 4.1 gf/mm (material without thrombin), as shown in Figure 4.4(a), and the averaged equilibrium force varied only slightly from 1.00 gf (material with 0.25 NIH/mL of thrombin) to 1.18 gf (material with 1.0 NIH/mL of thrombin), as shown in Figure 4.4(b). A difference is however noticeable between the stiffness of the biomaterial (mean of 3.9 gf/mm across all 4 concentrations) and the stiffness of PRP (mean of 3.1 gf/mm), indicating that the presence of CS increases the resistance of the biomaterial to compression. CS does not appear to have an impact on the equilibrium force.

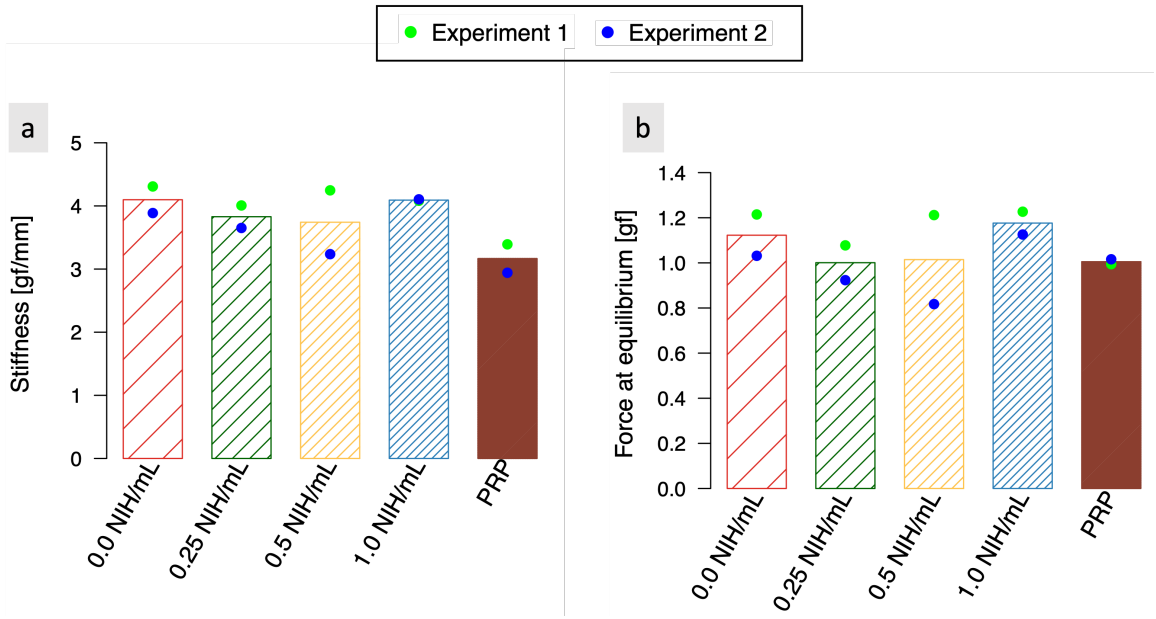


FIGURE 4.4 Average stiffness and force at equilibrium in response to an indentation compressive strain (amplitude of 0.7 mm – < 10% of sample's height –, speed of 0.07mm/s) for biomaterials with different concentrations of thrombin (0.0, 0.25, 0.5 and 0.1 NIH/mL) as well as for PRP. The presence of additional thrombin appears to leave unchanged the mechanical properties of the completely coagulated clot. Both the stiffness and the force at equilibrium remained stable across every thrombin concentration tested. A difference is however noticeable between the stiffness of the biomaterial and the stiffness of PRP, indicating that the presence of CS increases the resistance of the biomaterial to compression. CS does not appear to have an impact on the equilibrium force. N=2 and n=3.

4.4.5 The adherence of the biomaterial to tendon tissues is impacted by the biomaterial-tendon contact duration and increases faster when thrombin is present

Ex vivo studies were performed to investigate the adherence between the biomaterial and tendon tissues, examining the impact of the biomaterial-tendon contact duration and the biomaterial incubation time in the syringe before being delivered to the tendon. We wanted to study 1) if the adherence increased with the contact time and 2) if the adherence decreased if the coagulation process had already evolved for a few minutes in the syringe. Results indicated that the adherence of the biomaterial to tendon tissues was significantly affected by the contact duration, with a longer waiting time resulting in less biomaterial dissolution in the fluid, as shown in Figure 4.5(a). The adherence increased faster with the presence of thrombin, which accelerated the coagulation process. In contrast, our results indicate that the time the biomaterial spent in the syringe before application has less impact on the adhesion

than the biomaterial-tendon contact duration. Moreover, increasing the incubation time in the syringe did not reduce adhesion, but instead enhanced it, as shown in Figure 4.5(b). As a result, surgeons can safely wait a few minutes after rehydrating and placing the biomaterial in the syringe before injecting it.

Figures 4.5(c), 4.5(d), and 4.5(e) show the biomaterial on the tendon immediately after injection, after a 1-minute plunge in fluid following its application, and after a 1-minute plunge in fluid following a 5-minute wait after its application, respectively. Most of the biomaterial dissolved in fluid after 1 minute in the absence of a waiting period, while most of it remained on the tendon after a 5-minute waiting period.

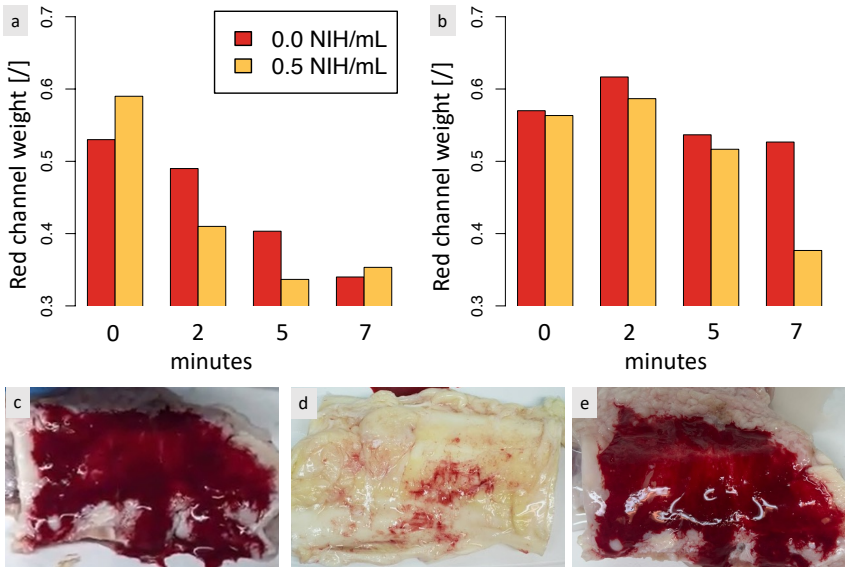


FIGURE 4.5 Quantification of the adherence of the biomaterial to tendon tissues when soaked in 0.9% NaCl for biomaterial with and without 0.5 NIH/mL of thrombin. After soaking, a photo of the NaCl solution was taken and the amount of biomaterial detached from the tendon was quantified by its red channel weight. a) The biomaterial was injected on the tendon immediately after reconstitution with PRP and left for 0, 2, 5 or 7 minutes. The tendon was then soaked in 0.9% NaCl. b) The biomaterial was left for 0, 2, 5 or 7 minutes in a 10cc syringe before being placed on the tendon. A 2 minutes wait was then observed before soaking the tendon in 0.9% NaCl. c) Aspect of the biomaterial just after its injection on the tendon, before soaking. d) When no waiting time is observed after injection of the biomaterial, the biomaterial almost completely dissolved in 0.9% NaCl when soaked. e) When a 5 minute waiting time is observed after injection of the biomaterial containing 0.5 NIH/mL of thrombin, the biomaterial does not dissolve when soaked in 0.9% NaCl and its aspect on the tendon seems unchanged. For results presented in a) and b), N=2 and n=2.

4.4.6 Limitations

One limitation of this study is the use of sheep blood to investigate a biomaterial that will eventually be prepared with human PRP and used in humans. Although sheep blood was found to be more similar to human blood than pig, rabbit or dog blood, significant differences in coagulation exist between these blood types [230]. In human, the onset of coagulation occurs later than in sheep, and the coagulation process is slower [230]. Furthermore, human thrombin was used with sheep blood, and it is important to note that thrombin from one species may not produce the same results in another species, as interferences may occur in the clotting reaction [231–233]. Given the above, we anticipate that the incorporation of human thrombin into our biomaterial will have a more pronounced effect when used in conjunction with human PRP. Currently, in the clinical trials, the biomaterial must rest in a syringe for 30-45 minutes after rehydration to obtain the desired consistency, which can be challenging/time-consuming during surgical procedures. Nevertheless, our results strongly suggest that the inclusion of thrombin will resolve this issue and facilitate the use of our biomaterial in clinical settings.

4.5 Conclusions

This proof-of-concept study successfully validated our two initial hypotheses. Firstly, it demonstrated that thrombin has the potential to accelerate the solidification of CS-PRP FD implants. Secondly, thrombin can be added to the formulation before FD, and a balance can be achieved to obtain a biomaterial both fast to coagulate and easy to handle/inject. Moving forward, it is important to conduct animal studies to provide further evidence that the CS-FIIa-PRP implants are safe and possess the same regenerative potential as CS-PRP implants. Additionally, future *in vitro* studies using the methodology developed here will allow us to investigate the solidification of CS-FIIa biomaterial rehydrated in human PRP and determine the optimal thrombin concentration. We are also conducting ongoing stability studies at -20°C, 4°C, and RT to further evaluate the performance of our biomaterial. With continued research and evaluation, we are confident that our CS-FIIa-PRP biomaterial has great potential for use in regenerative medicine applications.

CHAPITRE 5 ARTICLE 3 : FREEZE-DRIED CHITOSAN-THROMBIN-PLATELET-RICH PLASMA IMPLANTS IMPROVE SUPRASPINATUS TENDON REGENERATION IN A RABBIT ROTATOR CUFF REPAIR MODEL.

Authors : Fiona Milano, Anik Chevrier, Gregory De Crescenzo, and Marc Lavertu*

Submitted to Biomaterials research on 11 October 2024

This research was funded by ChitogenX, NSERC Alliance, Prima Quebec, the FRQNT (stipend allocated to F.M. via the PBEEE program), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (stipend allocated to F.M. via the NSERC-CREATE PrEEmiuM program) and the Canadian Foundation for Innovation.

F. Milano is with the Biomedical Engineering Institute, Polytechnique Montreal. A. Chevrier is with the Chemical Engineering Department, Polytechnique Montreal. G. De Crescenzo and *M. Lavertu are with the Chemical Engineering Department and the Biomedical Engineering Institute, Polytechnique Montreal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada (e-mail : marc.lavertu@polymtl.ca).

Acknowledgement The authors would like to thank Jun Sun for performing rabbit surgeries.

Author Contributions : Conceptualization, F.M., A.C. and M.L. ; Methodology, F.M., A.C. and M.L. Software analysis, F.M. ; Validation, F.M., A.C. and M.L. ; Formal Analysis, F.M. ; Investigation, F.M. ; Resources, M.L. ; Data Curation, F.M. and A.C. ; Writing – Original Draft Preparation, F.M. ; Writing – Review & Editing, A.C., M.L. and G.D.C. ; Visualization, F.M. ; Supervision, M.L. and G.D.C ; Project Administration, M.L. ; Funding Acquisition, M.L.

Détail de la contribution de F. Milano : Recherche bibliographique ; conceptualisation ; méthodologie ; expérimentation ; analyse des données ; utilisation de logiciels ; validation ; visualisation ; rédaction.

Keywords : chitosan, thrombin, platelet-rich plasma, injectable implant, rotator cuff

5.1 Abstract

Rotator cuff tears stand as the most prevalent shoulder condition prompting medical intervention. Failure rates as high as 60% have been reported after surgery, indicating the need for improved treatments. The aim of this study was to confirm whether an implant composed of freeze-dried chitosan and thrombin rehydrated in autologous platelet-rich-plasma (CS-FIIa-PRP) is effective to improve supraspinatus tendon regeneration in a New Zealand White rabbit model. Complete tears of the supraspinatus tendon were created bilaterally, then repaired using transosseous sutures. On the treated shoulder, CS-FIIa-PRP implants were injected both in the transosseous tunnels and on the tendon at the repaired site. Animals were sacrificed after 1 day (n=1), 2 weeks (n=6), 4 weeks (n=6) and 3 months (n=6). CS-FIIa-PRP implants were observed in the tunnels and on the tendon surface up to 4 weeks post-surgery and did not induce any deleterious effects. Using those implants in addition to sutures improved the macroscopic attachment of tendon to the humeral head at early timepoints (2 and 4 weeks), led to a faster improvement of the tendons' mechanical properties ($p<0.05$) and inhibited the development of heterotopic ossification ($p<0.01$). Rotator cuff regeneration using CS-FIIa-PRP implants is therefore a promising treatment for rotator cuff defects when combined with sutures.

5.2 Introduction

Rotator cuff (RC) tears are a prevalent condition, affecting about 10% of individuals under 20 years old, over 30% of those over 40, and up to 60% of those over 80 [23]. It ranks as the second most common musculoskeletal issue following lower back pain. RC tears are the primary shoulder condition for which patients seek surgical intervention [28, 234]. However, treating this condition represents a significant challenge because RC tendons have a limited regenerative capacity, mainly due to poor vascularization [28, 235].

A rotator cuff tear can be either partial (the tendon is damaged but not fully severed) or complete (tendon is entirely detached from bone) and affects one or more of the four muscle/tendon units comprising the rotator cuff [33, 236]. Tears occur mostly at the supraspinatus tendon (SSP) [237] and lead to degenerative structural changes such as fat accumulation in the muscle, muscle volume loss, muscle remodeling, and a reduction in the number of sarcomeres [238]. The standard surgery for rotator cuff tear repair is to suture the torn tendon back to the humeral head, using anchors that penetrate the bone. However, these standard treatments have a high postoperative failure rate, ranging from 20% to 60% [1]. It is hypothesized in the literature that a combination of factors are responsible for these

failures, including tendon degeneration, hypovascularization, muscle atrophy, and insufficient tendon-to-bone integration [239]. Regarding this last factor, it has been demonstrated that the rotator cuff insertion site (enthesis) does not fully reform after surgery. Instead of the type I collagen mainly constituting healthy tendons, the enthesis healing occurs through the synthesis of type III collagen, forming a disorganized and mechanically inferior scar tissue [40, 240].

To decrease the postoperative failure rate, numerous techniques have been developed or are in development. Among these, the use of platelet-rich plasma (PRP) is the most extensively explored cellular strategy in the literature [69].

PRP is a blood plasma enriched with platelets through centrifugation. Platelets can be activated by treatment with calcium chloride ($CaCl_2$), thrombin (FIIa), or contact with collagen [241]. Once activated, platelets release growth factors, including cytokines and bioactive factors that have chemotactic and paracrine roles : they regulate inflammation, angiogenesis, matrix synthesis, and tissue remodeling [28]. It has been proposed in the literature that the increase in the concentration of growth factors produced by PRP enhances tendon repair and promotes the revascularization of surrounding tissues [28, 242]. In practice, clinical study results are ambivalent [243] : some show a reduced rate of rotator cuff retear with PRP use (e.g., Jo et al. [70]), while others find no difference compared to standard treatment (e.g., Moraes et al. [71]). Similar mixed results are observed in preclinical studies, primarily conducted in rats [28]. The effectiveness of PRP for rotator cuff repair is thus an ongoing debate. The observed variation in effectiveness could result from the diversity of PRP isolation techniques (and thus PRP formulations), as well as from its high diffusibility and poor stability *in vivo* [16].

To palliate the inconsistent results observed when using PRP, our research group developed freeze-dried (FD) chitosan (CS) formulations. These formulations are intended to be solubilized in PRP, forming a viscous CS-PRP implant that can be injected at the site of surgery and coagulates in situ [18]. We previously demonstrated *in vivo* that the residency time of these implants is superior compared to PRP alone [18].

Chitosan is a linear polysaccharide consisting of randomly distributed glucosamine and N-acetylglucosamine units, obtained by the N-deacetylation of chitin (a polymer found in crustacean shells, primarily sourced from food industry residues). Chitosan is notable for its capacity to attract cells, its biodegradability, and its biocompatibility, making it suitable for numerous medical applications [244]. These applications include drug delivery, vaccines, gene therapy, and tissue engineering for various tissues. Chitosan can be utilized in multiple forms, including liquid, powder, microparticles, films, and porous matrices [6]. *In vivo* studies sho-

wed that our CS-PRP implants have superior bioactivity compared to PRP alone [18, 213]. They successfully augmented cartilage, meniscus, and rotator cuff repair in both small and large animal models [18, 88, 245, 246].

Recently, we developed a novel formulation of FD-CS with controlled, accelerated solidification by incorporating FIIa. This addition follows surgeons request to ease the biomaterial handling by enhancing its viscous properties and decreasing its solidification time. The addition of FIIa therefore aims to facilitate biomaterial administration and clinical implementation. The CS-FIIa-PRP implant was extensively studied *in vitro* and *ex vivo* to fine-tune its composition, resulting in a biomaterial that is easy to handle and rapidly coagulates [247].

The current study aimed to assess whether CS-FIIa-PRP implants can improve RC repair in a bilateral rabbit model with one control shoulder and one treated shoulder (transosseous suturing + CS-FIIa-PRP implant injection). Healing was evaluated through histology, micro-CT and non-destructive mechanical tests. Analysis time points ranged from one day to three months post-surgery. Our starting hypotheses were that CS-FIIa-PRP implants would : 1) lead to an acceleration of the improvement of the mechanical properties of the repaired tendons, 2) induce recruitment of polymorphonuclear cells (PMN) at early time points post-surgery and improve tendon healing through an increase in cell recruitment, angiogenesis, and bone remodeling, as previously observed for CS-PRP implants, 3) lead to a decrease in the amount of heterotopic ossification observed post-surgery.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Experimental design

The University of Montreal institutional committee approved the protocol for this study (Protocol #23–216), ensuring compliance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for the care and use of laboratory animals.

The study randomized 24 female New Zealand White rabbits into 6 groups (Table 5.1).

A first group (G1, 1 animal) was used to determine the location of the biomaterial one day after surgery. The rabbit was operated bilaterally, and the same treatment was applied to both sides (suturing + CS-FIIa-PRP).

A second group (G2, 4 animals) was used to develop and validate our non-destructive mechanical testing protocol and obtain reference values for the mechanics of healthy tendons. Animals in this group therefore did not undergo surgery.

A third group (G3, 1 animal) was necessary to validate that the test parameters defined for

mechanical tests on healthy tendons were not too aggressive for damaged tendons. An overly aggressive protocol could have led to tendon rupture and prevent histology and microCT from being performed. The animal in group 3 was operated bilaterally then repaired through standard surgery (without biomaterial) and euthanized on day 14. This surgery and time-point were expected to lead to the weakest tendons, which is why they were chosen for this validation test.

For groups G4-G6, the surgical model was bilateral : in each rabbit, one tendon was transected then repaired only by transosseous suturing (control shoulder). The other tendon was transected then treated by transosseous suturing augmented with application of CS-FIIa-PRP (treated shoulder). These groups were used to establish the evolution of the repair over time, with or without biomaterial. The animals were euthanized after 2 weeks (14 days, G4), 4 weeks (28 days, G5) or 3 months (84 days, G6). All animals in these groups were skeletally mature, aged 6.5-7 months at the time of surgery.

The animal from G1 was analyzed only using histology, while animals from G2-G6 underwent analysis using mechanical tests, microCT and histology. All groups are summarized in Table 5.1.

The performed mechanical tests are non-destructive tests. This design choice prevented us to obtain tendon rupture data, but allowed us to perform mechanical tests, microCT and histology on the same samples, therefore minimizing the number of animals needed to perform the study. Previous analysis of tendon properties showed a strong positive correlation between ultimate tensile strength and elastic modulus ($r^2 \simeq 0.79$) [139, 248]. This correlation is strong despite variations in mechanical properties between and within species as well as despite variations between healthy and injured tendons [139]. Stiffer tendons tend to be stronger, likely due to a consistent breaking strain across tendons (around 9%). Additionally, this relationship was shown by LaCroix *et al.* to be predictable [139]. Those studies confirmed our belief that rupture data would not offer significant information if the elastic modulus was already known.

Tableau 5.1 Experimental design

Group	Treatment shoulder 1	Treatment shoulder 2	Time points	#animals
G1	Suturing + CS-FIIa-PRP	Suturing + CS-FIIa-PRP	1 day	1
G2	Intact	Intact	NA	4
G3	Suturing only	Suturing only	2 weeks	1
G4	Suturing + CS-FIIa-PRP	Suturing only	2 weeks	6
G5	Suturing + CS-FIIa-PRP	Suturing only	4 weeks	6
G6	Suturing + CS-FIIa-PRP	Suturing only	3 months	6
Total animal number				**24**

CS = chitosan, FIIa = thrombin, PRP = platelet-rich-plasma

5.3.2 Rotator cuff tear model and surgical repair

The supraspinatus tendons in both shoulders were transected and immediately repaired, following the method previously described by Deprés-Tremblay *et al.* [16]. Briefly, a 3 cm incision was made on the rabbit's shoulder skin to expose the underlying muscle layers. The two muscle layers (osmotransverse and deltoid) were incised along their fiber orientation for 3 cm to reveal the supraspinatus tendon insertion site (Figure 5.1a). The supraspinatus tendon was completely cut with a scalpel blade approximately 3 mm from its insertion site (Figure 5.1b), and any remaining tendinous tissue was removed with surgical scissors and abrading with a drill. The tendon was then sutured to the greater tubercle using a "transosseous" technique, as previously described [16,249,250] : a 5 mm tunnel was drilled into the trabecular bone of the greater tubercle using a 2.1 mm diameter drill. Three smaller holes were drilled from the lateral side of the humerus to connect with the main tunnel using a 1.4 mm diameter drill (Figure 5.1c). Two 3-0 prolene sutures were used to attach the tendon to the greater tubercle. The first suture passed through the proximal hole, through the tendon in a modified Mason-Allen pattern and exited through the middle hole. The second suture passed through the middle hole, through the tendon in a modified Mason-Allen pattern and exited through the distal hole. The sutures were tied on the lateral side of the humerus, partially pulling the supraspinatus tendon into the tunnel (Figure 5.1d). Figure 5.1e-f summarize the procedure. The surgery was bilateral. For groups G1, G4-G6, at least one side was treated with an injection of CS-FIIa-PRP on the tendon at the repair site and in the bone tunnel (with the other side serving as a control for groups G4-G6).

The muscles and skin were then closed in layers using sutures. Bupivacaine (a long-acting local anesthetic, 1 mg/kg) was applied directly to the surgical site as a splash, along with lidocaine (a fast-acting local anesthetic, 1 mg/kg, intramuscular).

Rabbits were housed in individual cages and allowed *ad libitum* postoperative activity, food and water. They received a slow released buprenorphine injection (0.12 mg/kg) for pain control, as well as gabapentin up to three days post-surgery (20 mg/rabbit, twice daily).

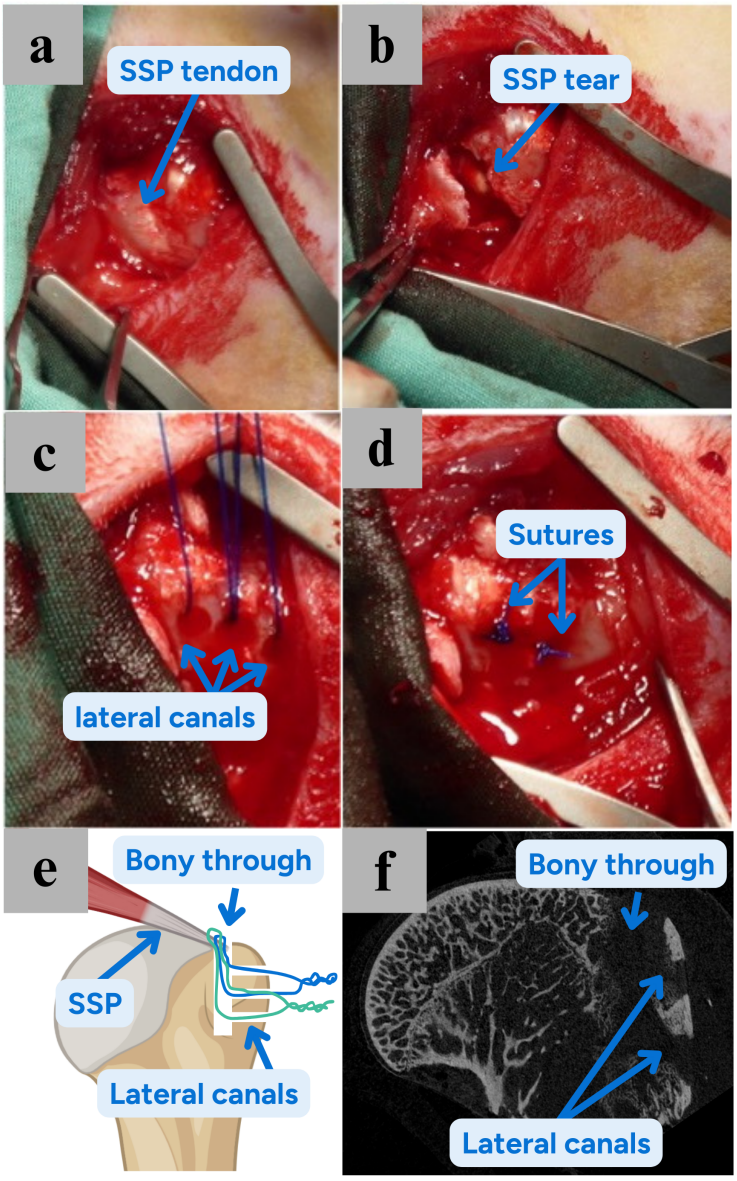


FIGURE 5.1 (a) The supraspinatus tendon was isolated. (b) A complete tear was created with a scalpel blade. (c) A main canal (bony trough) was drilled into the greater tubercle, then 3 smaller canals were drilled from the lateral side of the humerus. Two sutures were placed through the bony trough, the lateral canals and the tendon. (d) Sutures were tightened, partially pulling the tendon into the bony trough. (e) Global schematic of the procedure. (f) CT-scan showing the bony trough as well as two of the three lateral canals.

5.3.3 Preparation of freeze-dried CS-FIIa formulations

The preparation of the FD-CS formulations followed a method adapted from Chevrier *et al.* [2]. Raw chitosan (Primex, Siglufjordur, Iceland, Product No. 43030) was subjected to heterogeneous alkaline deacetylation, achieving a degree of deacetylation (DDA) of 83.7%, as measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy [217]. The CS was then depolymerized with nitrous acid to obtain a number-average molar mass (Mn) between 33 and 55 kDa. The final Mn was of 33 kDa and the final polydispersity index (PDI) was of 1.7, as determined using size-exclusion chromatography/multi-angle laser light scattering [218]. For imaging purposes, Rhodamine-labeled chitosan was added to the regular chitosan at a ratio of 1/10th of the total chitosan weight. The chitosan was dissolved in HCl overnight at room temperature to obtain a 1% (w/v) solution, with the HCl concentration adjusted to achieve 60% protonation of the CS amino groups. Calcium chloride (Spectrum, New Brunswick, NJ, USA, Product No. CA 95032-248) was added as a solidifying agent to reach a final concentration of 42.2 mM. Trehalose (Pfanstiehl, Waukegan, IL, USA, Product No. T-104-4) was then added as a lyoprotectant, for a final concentration of 1% (w/v). This mixture was filtered through a 0.22 μm filter and dispensed into glass vials (0.9 mL in each 2 mL vial). The final solution had a pH of 6.35 and an osmolality of 187 mOsm. 0.1 mL of thrombin from human plasma (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, Product No. T1063) diluted in a 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA - Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, Product No. A9418) solution was added to each vial to obtain a final thrombin activity of 0.50 NIH/mL and a BSA concentration of 0.01% (w/v).

The vials were then freeze-dried using a Millrock freeze-dryer (Laboratory Series LD85S3, Millrock Technology, Kingston, NY, USA) through the following cycle : (1) step freezing to 20 °C and holding isothermal for 15 minutes, then cooling to 5 °C and holding isothermal for 30 minutes, then cooling to -5 °C and holding isothermal for 30 minutes ; followed by ramp freezing to -40 °C at a rate of -1 °C/min and holding isothermal for 2 hours ; (2) ramp heating at 0.5 °C/min to 8 °C at 76 mTorr and holding isothermal for 650 minutes ; (3) ramp heating at 0.15 °C/min to 40 °C at 76 mTorr and holding isothermal for 6 hours.

The sterility of the final product was confirmed by Nucro-Technics (ON, Canada) using 18 vials. The endotoxin level was of 31.5 EU/g (mean for 2 vials), as assessed by Associates of Cape Cod (MA, USA). The homogeneity index of biomaterials rehydrated in PRP was of 74% for control samples and of 73% for samples with thrombin, as assessed by MASQ [19] following a method described in Milano *et al.* [247].

5.3.4 Preparation of PRP

Right before the surgery, 9 mL of blood was collected from the rabbit's ear. It was directly mixed with 1mL of 3.8% (w/v) sodium citrate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to prevent blood coagulation. PRP was prepared using the ACE EZ-PRP™ benchtop centrifuge through a two-step centrifugation method : 1) the anticoagulated blood was centrifuged at 1300 r/min (160G) for 10 minutes. The supernatant and the top 1–2 mm of the erythrocyte layer was collected. 2) This fraction was centrifuged again at 2000 r/min (400G) for 10 minutes. PRP was obtained by resuspending the bottom ∼1.5mL fraction of the resulting solution. The obtained PRP had an average platelet concentration of $500 \pm 200 \times 10^9/L$ (2.7 × higher than whole blood, mean value ± SD for 19 samples), leukocyte concentration of $7 \pm 5 \times 10^9/L$ (1.4 × higher than whole blood, mean value ± SD for 19 samples), and erythrocyte concentration of $3 \pm 1 \times 10^9/L$ (0.56 × that of whole blood, mean value ± SD for 19 samples).

5.3.5 Solubilization of freeze-dried CS-FIIa formulations in PRP and implants injection

FD CS-FIIa samples were rehydrated in 1 mL PRP. 300 μL of solution was retrieved from the vial with a 1-cc syringe equipped with a 25-G needle and injected in two phases after suturing of the tendon : 1) 150 μL was injected in the bony trough (bone canal) and allowed to flow out of the lateral tunnels, and 2) 150 μL was injected directly on the SSP tendon, on the sutures at the insertion site.

5.3.6 Specimen collection

Rabbits were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital (152 mg/kg). Both shoulders were immediately dissected, and the repair site was grossly inspected for inflammation and quality of tendon attachment. The SSP muscle-tendon-humerus complex was retrieved, carefully ensuring that the integrity of the repair tissue regions was not compromised, then wrapped in PBS-soaked gauze before being stored at -80°C pending mechanical testing.

5.3.7 Mechanical testing

A detailed description of the mechanical tests performed is given in Supplementary information 1 (Annexe G). Briefly, SSP muscle-tendon-humerus complexes were thawed overnight at 4°C, and the intramuscular tendon was isolated. The humerus was secured in a steel cylinder filled with orthodontic acrylic resin (Ortho-Jet, Lang Dental Manufacturing Co Inc., IL,

USA) and mounted to a Mach-1™ mechanical tester (Biomomentum Inc., QC, Canada), as shown in Figure 5.2a. Tendons were marked for tracking tissue displacement, with regions defined as 1) from the humerus to tendon–bone insertion (bone region, 0.5 cm long), 2) insertion to fibrocartilage tip (repair tissue region), and 3) fibrocartilage tip to grip, placed 1cm above (myotendinous region). Those 3 regions are shown in Figure 5.2b. To prevent slippage during tensile testing, 220 grit abrasive paper was placed in the grip (Biomomentum Inc., QC, Canada, Figure 5.2a-2). Tendons were preloaded at 5N, measured for width and thickness, then preconditioned with cycles of elongation before being preloaded to 30 N, a force guaranteeing being in the linear deformation zone. They were preconditioned again, then underwent twice the following sequence : 3% elongation, 600 seconds relaxation, sinusoidal deformations at 0.1Hz, 0.2Hz and 1.0Hz. The whole sequence is schematized in Figure 5.2c. Hydration was maintained with PBS, and visual data was recorded with a digital camera at 5fps (Figure 5.2a-3). Dynamic and static strain, dynamic modulus, and Young's modulus were computed, and deformation ratios for each region were determined. As previously done by Friel *et al.* [251], the deformation ratio for each region was computed as the change in segment length relative to the preloaded condition normalized by the total deformation of the tendon–bone complex. For example, the deformation ratio of region 1 is $L_1 - L_{01}/[(L_1 - L_{01}) + (L_2 - L_{02}) + (L_3 - L_{03})]$.

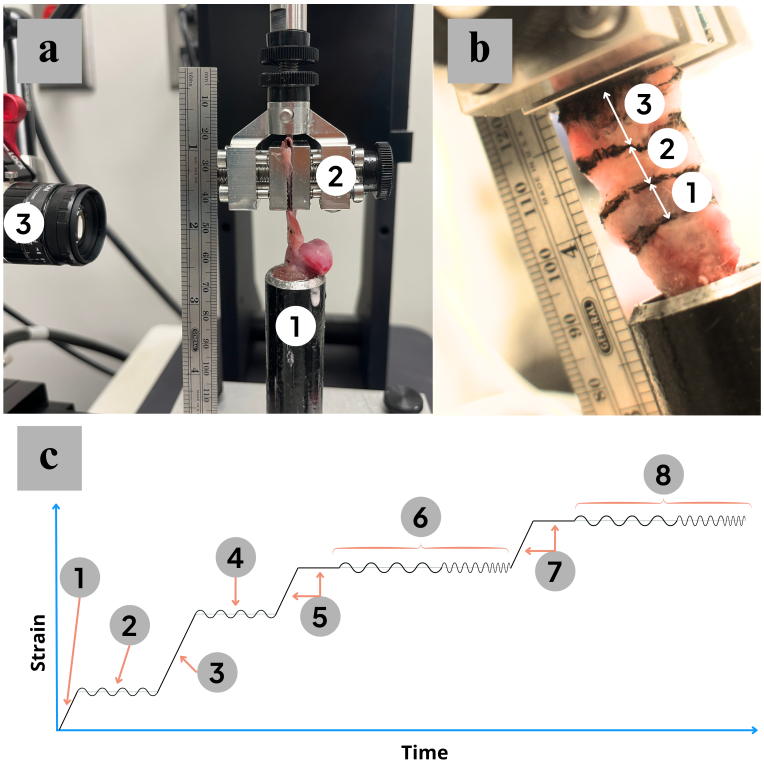


FIGURE 5.2 (a) Mechanical tests setup : 1. steel cylinder maintaining the humerus, 2. grip maintaining the tendon and 3. camera. (b) Regions delimited on the tendon and tracked through visual analysis during mechanical tests. 1. bone region, 2. repair tissue region, 3. myotendinous region. (c) Schematic of the mechanical test (scale, frequencies and number of cycles not to scale for clarity purpose). 1. 5N preload, 2. Preconditioning, 30 cycles at 0.125% elongation and 0.25 Hz, 3. 30N preload, 4. Preconditioning, 30 cycles at 0.25% elongation and 0.25 Hz, 5. Stress-relaxation : 3% elongation followed by 600 seconds of relaxation, 6. Sinusoidal deformation of 0.5% at 0.1, 0.2 and 1.0 Hz (10 cycles each), 7. Second stress-relaxation : 3% elongation followed by 600 seconds of relaxation, 8. Second sinusoidal deformation of 0.5% at 0.1, 0.2 and 1.0 Hz (10 cycles each).

5.3.8 Micro-CT analysis

Following mechanical testing, the humeral shaft was removed. The SSP tendon–humeral head complex and the piece of muscle were fixed with 10% neutral buffered formalin (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). The tendon-humeral head complex was then scanned with a Skyscan X-ray microtomography 1172 system (Kontich, Belgium) using an aluminum filter. The scan settings included a 13.7 µm pixel size resolution, an X-ray source voltage of 70 kV, a 1180 ms exposure time, 0.45° rotation steps, and three averaging frames. Image reconstruction was performed using NRecon software 1.6.1.5 (Kontich, Belgium) with the following parameters : a smoothing value of 2, ring artifact reduction of 10, and beam-hardening correc-

tion of 40%. The datasets were then repositioned using DataViewer software 1.4.3 (Kontich, Belgium).

The chosen region of interest (ROI) was a cylinder with a diameter of 2.1mm (surgical drill diameter) centered in the remaining bony trough (Figure 5.6e-g). The cylinder's height was of 3 mm, and globally spanned the two first lateral holes made during surgery. This ROI allowed us to analyze the bone repair in the bony trough. Furthermore, heterotopic ossification (HO) was observed. A second ROI was therefore defined as the whole scan minus the humeral head, allowing to analyze the amount of HO present for all samples.

A 3D micro-CT analysis of both ROIs was conducted using the global thresholding procedure in CTAn software 1.9.3.0 (Kontich, Belgium). The studied parameters were bone volume, bone surface, connectivity density, Euler number, trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number, trabecular pattern factor, structural model index, fractal dimension and degree of anisotropy.

5.3.9 Histological processing

Calcified tissues were decalcified in 0.5N HCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) with a trace amount of glutaraldehyde (EMS) for 2 weeks. The humeral heads and attached SSP tendons were cut in half then dehydrated in alcohol solutions and cleared with xylene (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) in preparation for paraffin embedding. One complete transverse section of 5 μm thickness was collected from each block. All sections included the SSP tendon, its attachment site, and the humeral head. They were stained using Iron hematoxylin/Safranin O/Fast Green (all from Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA,) before scanning with a Nanozoomer RS (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan).

Histological scoring of the SSP tendon and its enthesis was performed by one blinded observer following the criteria developed by Deprés-Tremblay *et al.* [23]. The following were scored for the tendons : cellularity, presence of tenocytes or inflammatory cells, vascularity, tissue organization, and heterotopic bone formation, on a scale from 0 (best) to 3 (worst). The enthesis was scored for tendon attachment quality, correctness of the attachment anatomical location, presence of GAGs at the insertion site, and structural appearance, with scores ranging from 0 (best) to 2 (worst) for the first three criteria, and from 0 (best) to 5 (worst) for structural appearance. The humeral head articular surfaces were evaluated using the OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system [252]. A muscle biopsy was performed before mechanical testing, and paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. Fatty infiltration in the SSP muscle was graded as minimal (0), mild (1), moderate (2), or marked (3).

5.3.10 Statistical analysis

Wilcoxon rank sum tests were used for mechanical tests results and CT-scan analysis (continuous data). Wilcoxon exact test was used for histological results (categorical ordinal data). Statistical tests were paired and one-sided to compare control and treated shoulder from the same animal. They were unpaired and one-sided to compare different timepoints or to compare intact samples with control or treated samples. Differences between values were considered statistically significant when *P $<$ 0.1, **P $<$ 0.05 and ***P $<$ 0.01.

5.4 Results and discussion

5.4.1 CS-FIIa-PRP implants adhered to SSP tendon tissue and were resident within the bony trough and lateral tunnels up to 28 days post-surgery

Rhodamine-CS was found in all samples at day 1 and day 14, as well as in 4 out of 6 shoulders at day 28. By day 84, rhodamine-CS had disappeared from all samples.

5.4.2 CS-FIIa-PRP accelerated the improvement of both structural and material mechanical properties 4 weeks after surgery

For each tendon, 3% and 6% elongations led to similar stiffness (<10% difference), ensuring that tests were performed in the linear deformation range of the tendons. Sinusoidal deformations also led to similar dynamic modulus for each of the three frequencies tested (<15% difference). Therefore, results are given for the 3% deformation only, and a mean of the results for the three frequencies was performed when applicable. Identical trends were observed when considering the 6% deformation. All studied mechanical properties are summarized in Table 5.2, providing their mean and 95% confidence interval and indicating if significant differences are observed between conditions. Figure 3a shows that the cross-sectional area of the supraspinatus tendon was significantly increased for all groups when compared to intact tissue, indicating the presence of repair tissue during the whole study. The area appears stable over time for control tendons, while it significantly decreases for treated tendons between 2 and 4 weeks post-surgery. The area therefore was significantly lower for treated samples compared to control at both 4 weeks and 3 months post-surgery (Figure 5.3a and 5.3b).

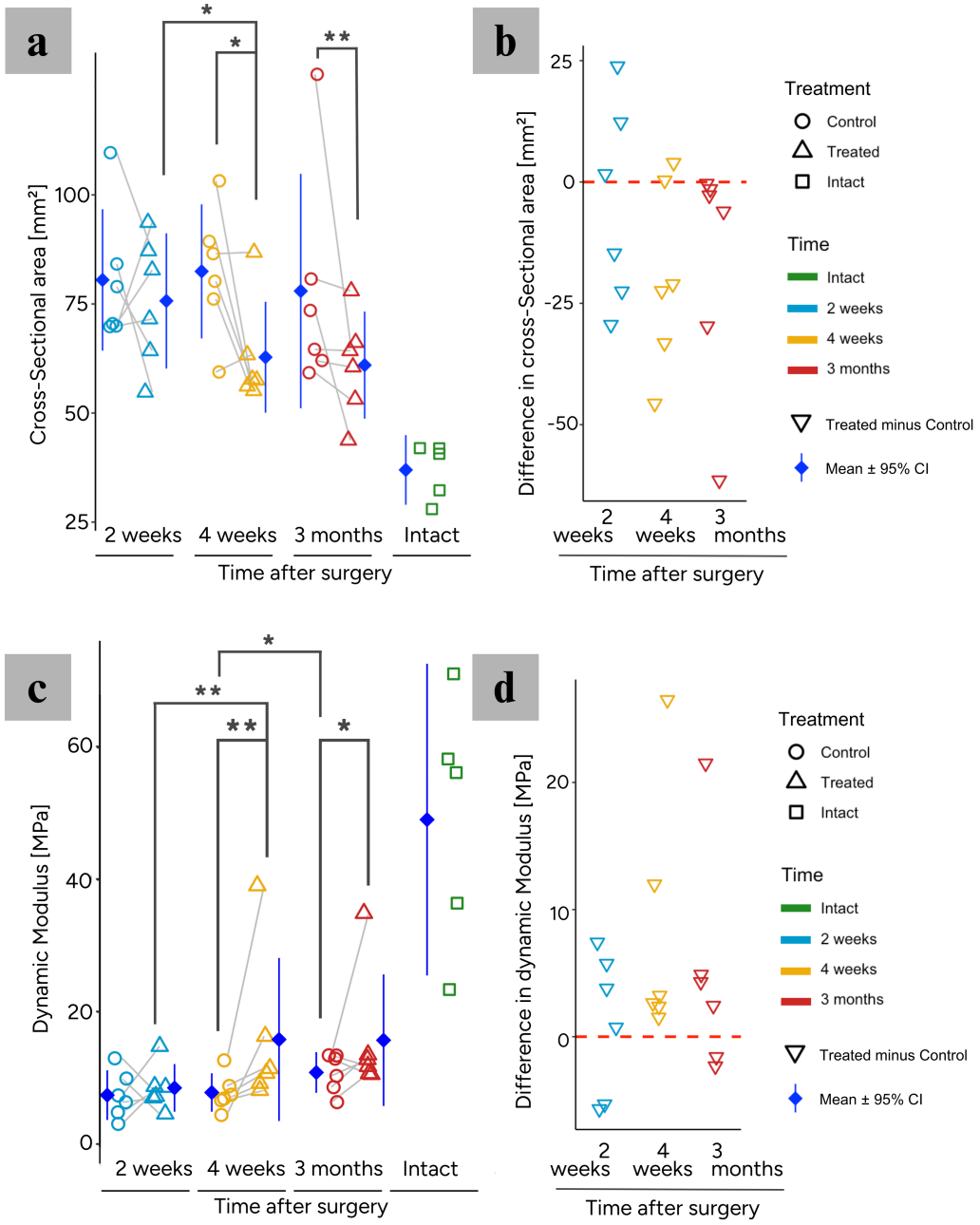


FIGURE 5.3 Supraspinatus tendon (a) cross-sectional area and (c) dynamic modulus for each study group. Links between data identify paired samples. The cross-sectional area decreases for treated groups, while the dynamic modulus increases over time after surgery for both control and treated groups. In both cases, a significant difference between treated and control shoulders is observed after 4 weeks and 3 months. (b) and (d) shows the differences between treated and control tendon's dynamic modulus or cross-sectional area (respectively), on which the Wilcoxon rank sum test is based. These results indicate that CS-FIIa-PRP implants accelerate tissue repair. *p-value<0.1, **p-value<0.05. Note : statistical comparison with intact group is not shown for the sake of clarity. All significant comparisons are given in Table 5.2.

TABLEAU 5.2 Tendon mechanical properties (data shown as mean±95% confidence interval).

		Healthy	2 weeks		4 weeks		3 months	
			Control	Treated	Control	Treated	Control	Treated
Area [mm^3]		37.0 ± 5.1^{g}	80.5 ± 12.4	75.7 ± 11.8	82.5 ± 11.7	$62.8 \pm 9.7^{a,c}$	78.0 ± 20.5	$61.0 \pm 9.3^{b,c}$
Material properties	Dynamic modulus [MPa]	53.2 ± 16.6^{g}	6.2 ± 3.3	8.4 ± 2.6	7.6 ± 2.1	$15.2 \pm 8.7^{b,d}$	$10.1 \pm 2.4^{c,e}$	$14.7 \pm 7.4^{a,d}$
	Young modulus [MPa]	39.9 ± 9.7^{g}	5.5 ± 1.6	7.4 ± 1.9	6.2 ± 1.4	$12.3 \pm 6.9^{b,c}$	$8.7 \pm 1.7^{d,f}$	12.0 ± 4.4^{c}
	Peak Stress [MPa]	1.81 ± 0.29^{g}	0.36 ± 0.09	0.43 ± 0.08	0.40 ± 0.10	$0.66 \pm 0.14^{b,d}$	$0.54 \pm 0.08^{d,f}$	$0.65 \pm 0.18^{a,d}$
	Equilibrium Stress [MPa]	1.21 ± 0.14^{g}	0.24 ± 0.06	0.27 ± 0.08	0.29 ± 0.07	$0.44 \pm 0.10^{b,d}$	$0.39 \pm 0.07^{d,e}$	0.49 ± 0.13^{d}
Structural properties	Stiffness [N/mm]	78.6 ± 20.5^{g}	25.5 ± 8.5	30.6 ± 14.7	29.3 ± 43.9	$41.5 \pm 19.1^{b,c}$	$37.9 \pm 7.3^{d,f}$	$38.4 \pm 7.7^{a,d}$
	Peak Load [N]	66.7 ± 8.4^{g}	28.9 ± 6.6	33.8 ± 9.9	31.2 ± 4.0	40.3 ± 8.3^{c}	40.5 ± 2.9^{d}	39.8 ± 4.7
	Equilibrium Load [N]	45.0 ± 6.4^{g}	19.2 ± 4.8	21.3 ± 9.0	23.0 ± 2.6	27.5 ± 6.0	$29.0 \pm 1.7^{f,d}$	28.2 ± 3.4^{c}
	Load ratio [N]	32.7 ± 5.7	34.2 ± 4.4	38.8 ± 10.1	26.9 ± 4.6^{d}	33.1 ± 6.4	26.7 ± 5.1^{c}	24.6 ± 4.6^{d}

a = p<0.1 compared to paired shoulder
b = p<0.05 compared to paired shoulder
c = p<0.1 compared to week 2, same treatment
d = p<0.05 compared to week 2, same treatment
e = p<0.1 compared to week 4, same treatment
f = p<0.05 compared to week 4, same treatment
g = p<0.05 compared to all other group

Biomechanically, the elastic structural (stiffness) and material (Young modulus and dynamic modulus) properties both increase over time after surgery, as shown in Table 5.2. Even though they are still several times lower than for intact samples 3 months after surgery for both control and treated tendons, a significant difference is observed between the control surgery and the surgery with the CS-FIIa-PRP biomaterial. The dynamic modulus and the stiffness both show a significant increase for treated tendons when compared to control after both 4 weeks and 3 months, while this difference is significant only after 4 weeks for the Young modulus. Furthermore, treated tendons shows a significant increase in all three properties between 2 and 4 weeks post-surgery, while for control shoulder, this increase occurs between 4 weeks and 3 months, suggesting that the CS-FIIa-PRP treatment accelerates tissue repair. The dynamic modulus is further shown in Figure 3c and 3d to highlight the relation between paired samples. One can see that after 4 weeks, its value is doubled in average for treated samples compared to control. Stiffness values reported in the literature for intact tendons are similar to those measured in the present study [251, 253, 254]. No significant difference is

observed in term of visoelastic structural properties (peak load, equilibrium load and load ratio) between control and treated shoulders, even though a significant increase in both peak and equilibrium load occurs for control tendons between 4 weeks and three months post-surgery, while this increase in non-significant for treated tendons. Of note, the load ratio is the only mechanical parameter showing no significant differences between intact tendons and each surgical study group.

Viscoelastic material properties (peak stress and equilibrium stress) however show a significant increase for treated tendons when compared to control after 4 weeks. Peak stress also shows a significant increase for treated tendon compared to control even after 3 months. Similarly to elastic properties, treated tendons shows a significant increase in viscoelastic material properties between 2 and 4 weeks post-surgery, while for control shoulder, this increase occurs between 4 weeks and 3 months, indicating a delay in tissue repair. Even though the mechanical properties evolve over time post-surgery, they were all (except the load ratio) still significantly lower than properties of intact tissues, even after 3 months. The significance level of all statistical comparisons is given in Table 5.2.

The analysis of the regional contribution to the total deformation indicated that, in intact tendons, the region deforming the most is the myotendinous region ($\sim$60% of the deformation), then the repair tissue region ($\sim$40% of the deformation), as shown in Figure 5.4a-c. Even though proportions slightly differ, these observations follow the trends previously observed by Friel *et al.* [251]. Two weeks after surgery, this trend is inverted for both control and treated tendons, indicating that a change in tendon tissues nature is taking place during repair. However, treated tendons tend to return to intact ratios 4 weeks after surgery, while it takes 3 months for control tendons (Figure 5.4a-c). This is in accordance with the delay in mechanical properties increase observed for several parameters.

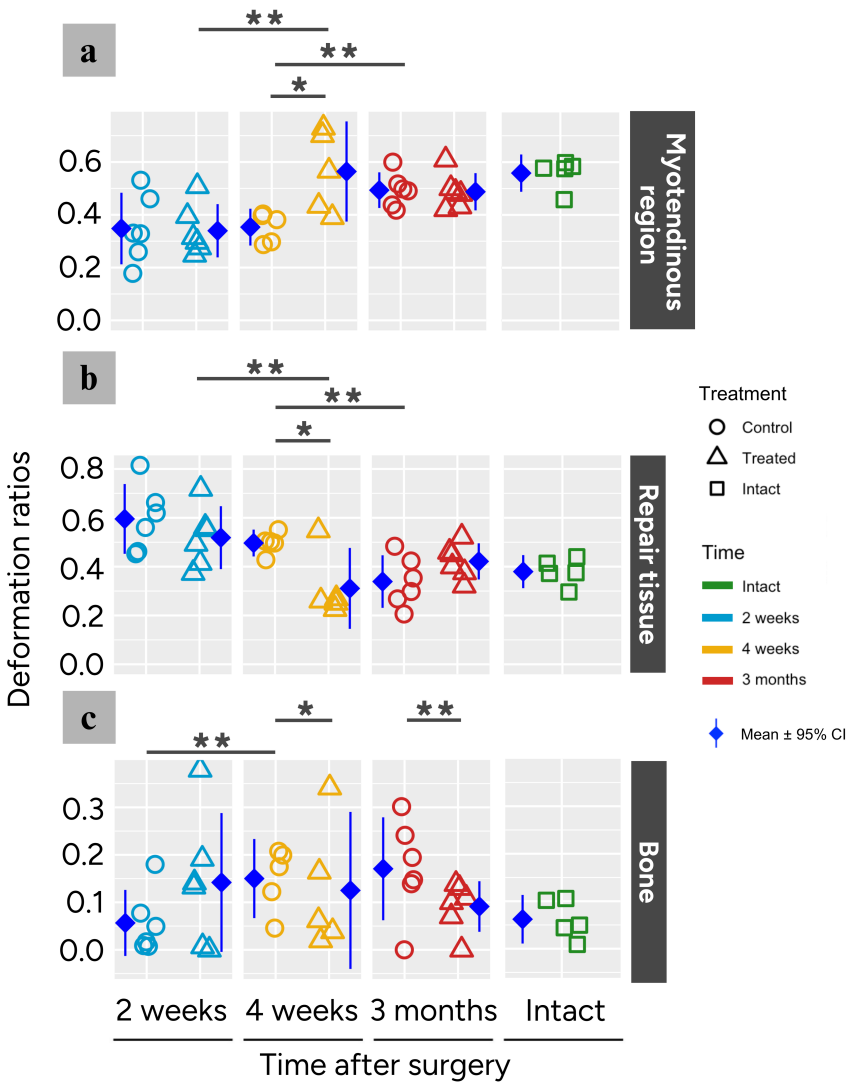


FIGURE 5.4 Supraspinatus tendon deformation per zone. (a) Deformation ratios of the myotendinous zone, (b) of the repair tissue zone and (c) of the bone zone. These three zones are defined in Figure 2b. In intact tendons, the zone deforming the most is the myotendinous zone (∼60% of the deformation), then the repair tissue zone (∼40% of the deformation). 2 weeks after surgery, this trend is inverted for both control and treated tendons, indicating that a change in tendon tissues nature is taking place during repair. However, treated tendons tend to return to intact ratios 4 weeks after surgery, while it takes 3 months for control tendons. These results indicate that CS-FIIa-PRP implants accelerate tissue repair. Statistical comparison with the intact group is not shown on figure for the sake of clarity. The deformation of the repair tissue zone in the control group is significantly superior to the one of intact tissue after both 2 and 4 weeks ($p<0.05$). For treated tendons, a significant difference is observed after 2 weeks on the same zone ($p<0.1$) but disappears after 4 weeks. In the bone zone, the deformation is superior for all operated groups compared to intact tendon (p-value<0.1 for control after 2 weeks, treated after 4 weeks and treated after 3 months, and p-value<0.05 for treated after 2 weeks, control after 4 weeks and control after 3 months), indicating the presence of soft repair tissue in that zone. *p-value<0.1, **p-value<0.05.

In the bone zone, the deformation is superior for all operated groups compared to intact tendon due to the presence of repair tissue, even 3 months after surgery. However, a significant decrease is observed between treated and control samples after both 2 and 4 weeks. This result can be linked to the decrease in cross-sectional area measured over time for treated tendon. Indeed, it was visually assessed that while the cross-sectional area decreases, less tissue was present in the bone zone. Even though non-significant, trends seem to suggest that the deformation in this zone decreases over time for treated samples while it increases for controls. The observed increase in viscoelastic properties and the analysis of the regional contributions therefore both indicate that CS-FIIa-PRP implants accelerate tissue repair.

5.4.3 CS-FIIa-PRP implants inhibited heterotopic ossification of SSP tendon tissue three months after surgery

Heterotopic ossification (HO) was observed after surgery, mainly in control shoulders. HO is an abnormal bone formation occurring in soft tissues, where bone is normally not found. It is thought to occur following soft-tissue damage [161]. Even though it is rarely seen after rotator cuff arthroscopic repair [255], it is a well know complication following shoulder arthroscopy in human, whith a prevalence rate around 6% [162]. It is also frequently observed in rabbit models of rotator cuff tears [16, 256, 257]. HO is thought to be due to the release of osteoinductive factor, even though the pathogenesis is unclear. HO is the result of an endochondral ossification process, where hyaline cartilage is replaced by bone [161]. Its first step is the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes, which secrete the extra-cellular matrix composing cartilage. In our study, histology showed neo-chondrogenesis (formation and development of new cartilage) after 2 weeks in 5 out of 6 control shoulders, compared to only 1 out of 6 treated shoulders. Neo-chondrogenesis was not observed at later timepoints. For some samples after both 4 weeks and 3 months, HO fragments were big enough to be detected during gross pathology. More than one fragment could be observed. Micro-CT was used to compute the exact HO volume and number of fragments for each sample. Figure 5.5a and 5.5b show there is significant difference between treated and control shoulders after 3 months (p-value$<$0.05). This trend is already detected 4 weeks after surgery, even though non-significant. All surgical groups show a significant increase in HO volume compared to intact samples (p-value$<$0.1 for control after 2 week and all treated groups, and p-value$<$0.01 for control groups after 4 weeks and 3 months). Control shoulders also show more HO fragments compared to treated shoulders, as shown in Figure 5.5c ($p<0.1$ after 4 weeks and $p<0.05$ after 3 months). For control shoulders, the number of fragments also increases with time ($p<0.05$ between 2 weeks and 3 months). Fragments are computed as object having a volume above 2 mm^3 . No fragments are observed in any of the intact shoulders, the observed

HO volume is probably only due to white noise on CT-scan images. For reference, CT-scans of a control sample showing large HO fragments (total volume $> 100\ mm^3$) is shown in Figure 5.5d (coronal view) and 5e (transaxial view). These results indicate that CS-FIIa-PRP implants significantly inhibit the formation of HO by inhibiting neo-chondrogenesis. This is in accordance with results previously observed for CS-PRP implant by Depres-Tremblay *et al.* [16], although the phenomenon is more flagrant in the present study due to the additional timepoints and larger number of animals.

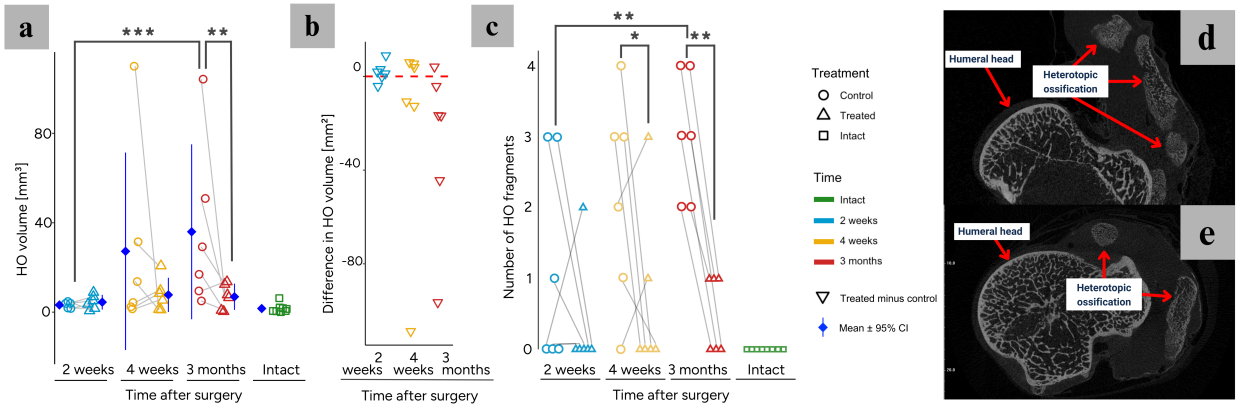


FIGURE 5.5 The presence of heterotopic ossification (HO) was detected in some tendons after surgery. More than one fragment of heterotopic bone can be present per repaired shoulders. (a) HO ossification total volume per shoulder, (b) difference in volume between treated and control side and (c) number of HO fragments per shoulder. Links between data identify paired samples. (d) Coronal and (e) transaxial CT-scans of a humeral head with HO are shown as reference for a control sample 4 weeks after surgery. The difference in volume between control and treated shoulder is significant after 3 months (p-value<0.05). The number of HO fragments was computed as the number of objects having a volume $> 2\ mm^3$. After both 4 weeks and 3 months, significantly more fragments are observed in control shoulders than in treated shoulders. These results indicate that CS-FIIa-PRP implants decrease HO formation. *p-value<0.1, **p-value<0.05, ***p-value<0.01. Statistical comparison with the intact group is not shown on figure for the sake of clarity but is given in the text.

5.4.4 CS-FIIa-PRP implants did not improve bone remodeling in the bony trough

For each timepoint studied, there was no significant difference between treated and control groups for any of the studied bone morphometric parameters assessed, except for the percent bone volume after 2 weeks (Figure 5.6a, p-value<0.1). This delayed increase in bone volume for treated samples might be a result of the increased inflammation observed for treated samples after 2 weeks compared to control (see histological results in next subsection).

Bone remodeling occurred up to three months for both control and treated groups as shown by the evolution of all studied parameters towards their value for intact samples. The percent bone volume and trabecular number both significantly increase during early repair, between weeks 2 and 4, as shown in Figure 5.6a and 5.6c. As a reference, Figure 6e shows the scan of a sample 2 weeks after surgery with the ROI highlighted. One can observe the absence of bone in the drilled hole. 4 weeks after surgery, small trabeculae can be observed in the ROI (Figure 5.6f). They appear thinner and numerous when compared to the surrounding intact bone. 3 months after surgery, the bony trough was difficult to detect on micro-CT images of humeral heads. Trabeculae appear similar in the ROI and in surrounding intact tissues, as shown in Figure 5.6g.

This is in concordance with the fact that the connective density significantly decreases during late repair, between 4 weeks and 3 months, as shown in Figure 6d. Even though not significant, trabecular number seems to decrease between 4 weeks and 3 months. The trabecular thickness evolves during the whole repair period, significantly increasing between all three timepoints for control shoulders, and between 4 and 12 weeks for treated shoulders (Figure 5.6b).

These findings indicate that CS-FIIa-PRP implants did not induced bone remodeling when compared to sutures only. This is in contradiction with observation made by Deprés-Tremblay *et al.* with CS-PRP implants [16]. However, our observations are coherent with other studies indicating that complete repair of the bony trough in a rabbit RC tear model occurs around 12 weeks post-surgery [258].

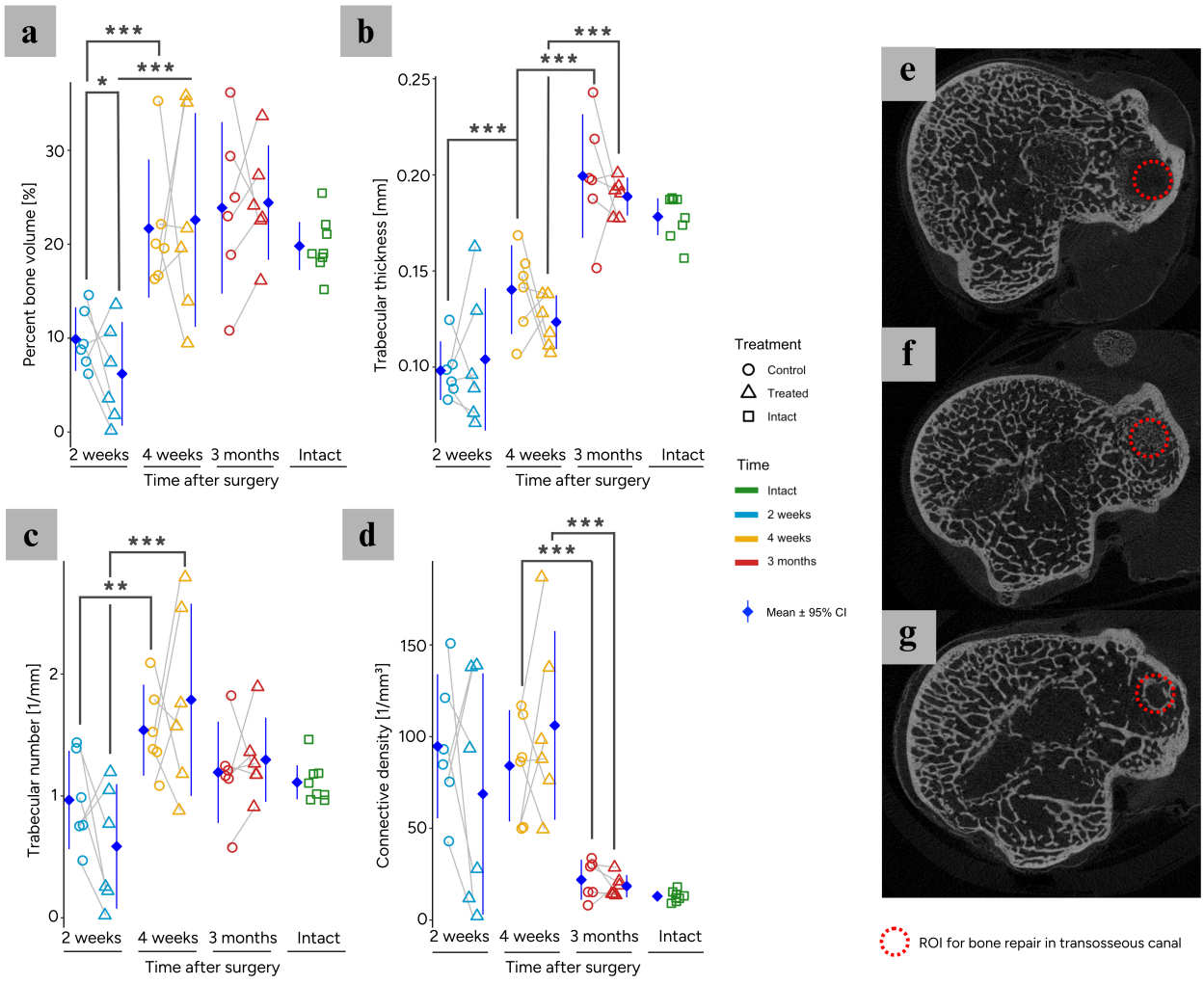


FIGURE 5.6 Micro-CT analysis of bone repair in the transosseous canal 2 weeks, 4 weeks and 3 months after surgery. Four parameters are analyzed : (a) percent bone volume, (b) trabecular thickness, (c) trabecular number and (d) connective density. Links between data identify paired samples. No significant differences are observed between treated and control group, except for the percent bone volume after 2 weeks (p-value <0.1). However, bone repair is observed over time and all 4 parameters evolve toward values of intact bone : the percent bone volume and trabecular number both significantly increase during early repair (between weeks 2 and 4) for control and treated shoulders, while the connective density significantly decreases between 4 weeks and 3 months post-surgery. The trabecular thickness significantly increases between all three timepoints for control shoulders, and between 4 and 12 weeks for treated shoulders. For reference, micro-CT scans of the humeral head after 2 weeks (e), 4 weeks (f) and 3 months (g) are provided. After 2 weeks, the canal is almost empty, while after 3 months bone repair is almost completed, and the canal is difficult to detect. *p-value<0.1, **p-value<0.05, ***p-value<0.01. Statistical comparison with the intact group is not shown on figure for the sake of clarity.

5.4.5 CS-FIIa-PRP implants induced inflammation, improved macroscopic tendon attachment and influenced attachment location

For all test groups, the structural organization of the repaired SSP tendons was significantly different than for intact tendons (Figure 5.7a-b). Both control and treated tendons had increased cellularity and vascularity (Figure 5.7c-d). Mild to moderate fatty infiltration was found in several tendons from both treatment groups (Figure 5.7e-f).

Inflammatory cells (polymorphonuclear cells - PMNs) were absent from all control shoulder but were driven to the repair site by the presence of CS-FIIa-PRP implants ($p<0.05$). Inflammatory cells were observed in all treated shoulders at 14 days, and in 4 out of 6 treated shoulders at 28 days (Figure 5.7g-h). Those 4 shoulders were the ones in which rhodamine-CS was still present after 28 days, confirming that CS presence drives the inflammation process. This inflammation had completely resolved by 3 months.

Indeed, it is known that CS with a DDA of 50-80% often attract PMNs and stimulate the innate immune response to recruit more neutrophils and macrophages [6]. Cells involved in tissue repair (such as platelet, PMNs and fibroblasts) release growth factors which are believed to play a role in early SSP tendon repair [259]. It is likely that our treatment acts on such signals to modulate the healing response [16].

As previously stated, neo-chondrogenesis was mainly observed in control tendons (Figure 5.7i-j), leading to heterotopic bone formation (Figure 5.7k-l). Histological results show that CS-FIIa-PRP implants decrease neo-chondrogenesis at 2 weeks ($p<0.05$) and heterotopic ossification after 4 weeks ($p<0.1$) and 3 months ($p<0.1$). This observation is consistent with gross pathology and micro-CT analysis. Endochodral ossification and new bone formation adjacent to the humeral cortical bone can be observed on Figure 5.7e.

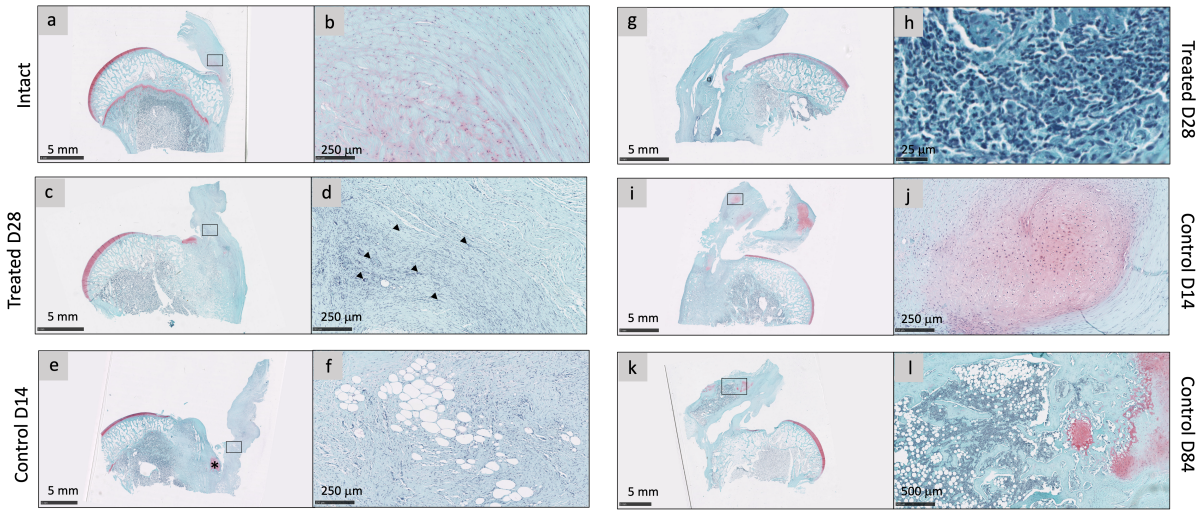


FIGURE 5.7 Safranin O/Fast Green stained paraffin sections. (a-b) Intact shoulder. (c-d) Increased cellularity and vascularity was found in both treatment group compared to intact. (e-f) Mild to moderate fatty infiltration was found in several tendons from both treatment groups. (g-h) Inflammatory cells were observed in treated shoulders up to day 28. (i-j) Neochondrogenesis, followed by (k-l) heterotopic ossification was observed, mainly in control tendons. ▶ points to blood vessels and * indicates endochondral ossification and new bone formation adjacent to the humeral cortical bone

As for the SSP tendon itself, the structural organization of its insertion site was significantly different for all test groups compared to intact tendons (Figure 5.8a-b). Complete or partial gaps were observed during gross pathology in 5 out of 6 controls, compared to 3 out of 6 treated tendons at both 2 and 4 weeks. This suggest that CS-PRP-FIIa implants improves tendon attachment at a macroscopic scale. The averaged gap area decreased by a factor of 4 between 2 and 4 weeks but was similar for control and treated samples. No gaps were macroscopically observed after 3 months. However, no difference in attachment was observed at a microscopic scale for any of the timepoints. Complete or partial gaps between the tendon and the humeral head were observed in several histological sections in both control and treated groups (Figure 5.8c-d). It is worth mentioning that although no macroscopic tears in the tendons were visually observed during mechanical tests, micro-gaps might have appeared. Given the improved mechanical properties observed after 4 weeks and 3 months when using CS-FIIa-PRP implant, we expected to observe a better structural organization of the insertion site, or an enhanced bone remodeling in the bony trough. Since none of those phenomena occurred, our hypothesis is that the enhanced mechanical properties may derive from the type of collagen produced during repair. Indeed, type III collagen is indicative of scar-mediated response [75, 260], while type I collagen represent 95% of the intact tendon's

collagens. Type III collagen is known to form a disorganized and mechanically inferior scar tissue [40]. However, the type of collagen present at the repair site was not analyzed during the present study. In case of successful attachment, the tendon was attached either at the original enthesis (Figure 5.8e-f), lower on the humeral cortical bone (Figure 5.8g-h) or at both sites simultaneously (Figure 5.8i-j). The attachment of tendons on the humeral cortical bone explains the presence of soft repair tissues in the bone zone defined for mechanical testing and further explains why a deformation was observed in this zone at all time points. After 3 months, the attachment site appears more anatomically correct for treated tendons than for control tendons ($p<0.05$). Although we have no hypothesis explaining this observation, this suggests that CS-FIIa-PRP helps repair tissues to develop at the original enthesis site. This surprising result was also previously observed for CS-PRP implant by Deprés-Tremblay *et al.* [16].

Most of the insertion sites in both control and treated groups consisted of vascularized fibrous tissues at 2 and 4 weeks (Figure 5.8k-l). Fibrocartilage (Figure 5.8m-n) and, in a few cases, a partial tidemark (Figure 5.8o-p) were observed at some insertion sites of both control and treated groups after 3 months. Raw results of microscopic scoring of tendon and enthesis along with statistical comparisons are detailed in Supplementary Information 2 (Annexe H).

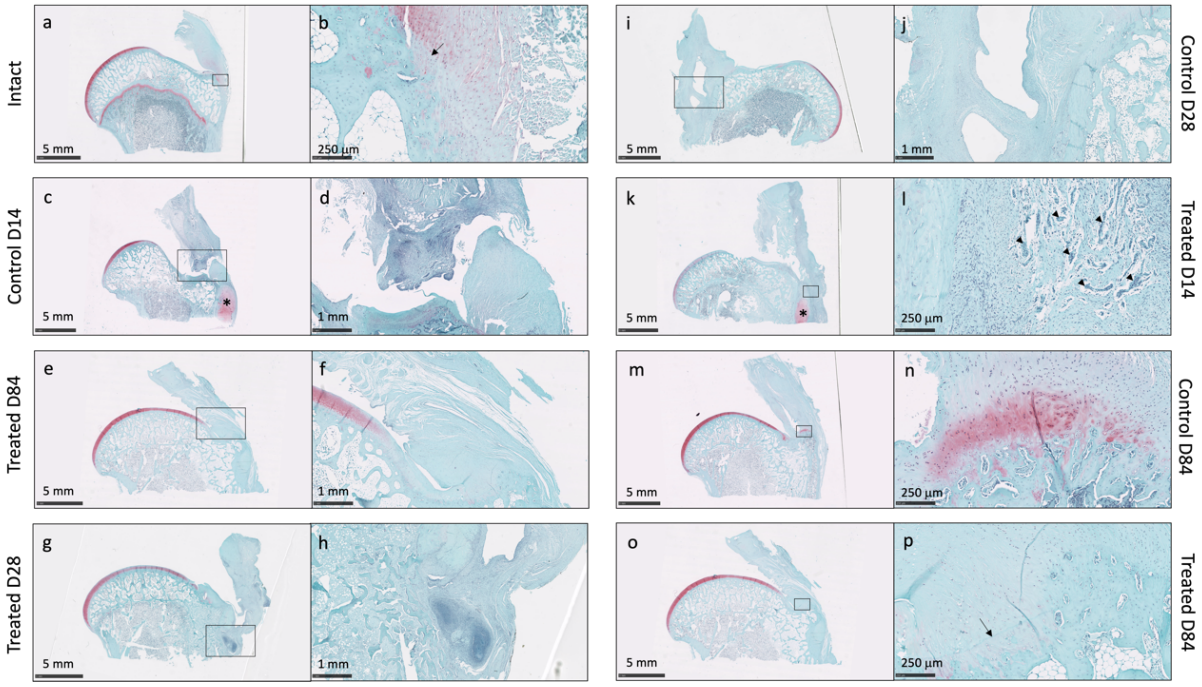


FIGURE 5.8 Safranin O/Fast Green stained paraffin sections. (a-b) Intact shoulder. (c-d) Complete or partial gaps were observed between SSP tendons and the humeral head in several sections for studied groups. In case of successful attachment, the tendon was attached either at (e-f) the original enthesis location, (g-h) lower on the humeral cortical bone or (i-j) at both locations simultaneously. (k-l) Most of the insertion sites in both treatment groups consisted of vascularized fibrous tissues at 14 and 28 days. (m-n) Fibrocartilage and, in a few cases, (o-p) a partial tidemark, were observed at some insertion sites of both treatment groups at 84 days. → points to tidemark, ▶ points to blood vessels and * indicates endochondral ossification and new bone formation adjacent to the humeral cortical bone.

5.4.6 CS-FIIa-PRP treatment was safe

The surgery seemed well tolerated by all rabbits. They favored their back limbs in the days following surgery but went back to a normal usage of their front limbs under a week. A week after surgery, they did not show signs of pain or weakness and were back to their pre-surgery weight (which was stable for the rest of the study). CS-FIIa-PRP implants did not induce any adverse event, as shown by the absence of infection and effusion at the surgical site, mobility disability, sign of pain, or excessive inflammation.

Gross inspection upon necropsy revealed the presence of scar tissue throughout the repair region, adhering to both surrounding bones and muscles (acromion, deltoid, infraspinatus and subscapularis). However, the amount of scaring appeared to decrease with time for both control and treated samples. It also appeared to be lower for treated samples than for controls

after 3 months, which is coherent with the measured decrease in tendon cross-sectional area as well as the amount of tissue in the "bone zone".

Microscopic analysis showed that the humeral head articular cartilage was structurally sound in both treatment groups at all time points and not different from intact. Similar minimal to mild fatty infiltration was found in SSP muscles of both treatment groups at all times compared to intact tissue.

5.4.7 Limitations

Rabbit was chosen as an animal model because their rotator cuff healing is similar to humans. Furthermore, they allowed sufficient blood collection for the required autologous PRP volume needed to solubilize freeze-dried CS-FIIa biomaterials. However, no animal model perfectly replicates human injuries and repair process. Rabbits have weight-bearing shoulder joint, and their RC anatomy differs from that of humans. The acute tears model used also differs from human chronic degenerative tears. Moreover, due to RC joint small size, the transosseous repair technique used in our study did not involve any suture anchors, as is commonly used in humans. Additionally, post-operative activity was allowed and may have caused sutures to pull out of the tendon, hindering the repair process.

To our knowledge, this study is the first to perform non-destructive mechanical tests of rabbit SSP tendons before using the same samples for histology. While this drastically reduces the number of animals needed for the study, we do not know if the mechanical tests damaged the tendon at the microscopic scale, therefore modifying the structure of the tissues observed through histology. Further studies should be performed on the matter.

Future work should 1) involve a larger number of animals to study further the non-significant trends observed, 2) include a suturing-PRP group to distinguish between the action of CS-FIIa-PRP implants compared to PRP alone and 3) study further the mechanism of action of the biomaterial through immunohistological staining.

5.5 Conclusion and future studies

Rotator cuff repair remains a pressing clinical challenge. Despite our study's limitations, our preliminary study showed that CS-FIIa-PRP implants were retained at the site of injection and did not induce deleterious effects in the joint. In addition, using CS-FIIa-PRP implants in conjunction with transosseous suturing led to a faster improvement of both structural and material mechanical properties (starting hypothsesis 1), improved macroscopic attachment of the SSP tendon to the humeral head compared to suturing alone and inhibited the heterotopic

ossification development (starting hypothesis 2). However, we expected the biomaterial to impact bone remodeling in the bony trough (starting hypothesis 3), but no differences were found compared to control.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les trois études présentées dans cette thèse couvrent un éventail allant du développement d'un nouvel algorithme pour la quantification de l'homogénéité (MASQH) à l'application de biomatériaux à base de chitosane (CS-FIIa-PRP) visant à améliorer la réparation tissulaire dans les applications orthopédiques. Chaque étude apporte des perspectives uniques sur le comportement, la stabilité et l'efficacité de ces biomatériaux, offrant une compréhension globale de leur potentiel dans un contexte clinique.

La première étude propose une définition de la notion d'homogénéité et introduit MASQH, un algorithme conçu pour quantifier l'homogénéité dans les images, répondant ainsi au manque de définition et de méthodes robustes dans ce domaine. L'algorithme a été testé sur des images synthétiques et sa capacité à évaluer avec précision l'homogénéité à travers différentes distributions a été démontrée. L'algorithme fournit un indice final reflétant la distribution spatiale des pixels dans les images. Lorsqu'il a été appliqué à des échantillons réels, tels que des biomatériaux hybrides CS-PRP et des nanocomposites, MASQH a montré une grande fiabilité, correspondant aux classifications des experts et surpassant d'autres algorithmes dans certains cas. La force de MASQH réside dans sa versatilité, puisqu'il est applicable à différents types d'images, et dans sa robustesse, car il ne repose pas sur la segmentation.

La deuxième étude se concentre sur le développement et l'évaluation de biomatériaux à base de chitosane solubilisés dans du plasma riche en plaquettes et enrichis en thrombine (CS-FIIa-PRP). L'étude a révélé que l'ajout de thrombine accélère considérablement le processus de coagulation du biomatériau, le rendant plus adapté aux applications chirurgicales, en particulier celles réalisées en milieu humide. Nous avons également étudié la stabilité de ces biomatériaux sur deux mois, notamment à température ambiante.

Des tests rhéologiques ont montré que des concentrations plus élevées de thrombine entraînent une gélification plus rapide et une accélération de l'augmentation des modules de stockage et de perte, indiquant une accélération de la solidification du biomatériau. Entre autres, le biomatériau contenant 0.5 NIH/mL de thrombine permet d'obtenir une gélification quatre fois plus rapide que le biomatériau sans thrombine.

L'étude a également montré par des tests d'indentation que la présence de thrombine n'a pas significativement affecté la résistance finale du caillot, suggérant que la stabilité mécanique globale du biomatériau est restée constante malgré les différentes concentrations de thrombine utilisées. De plus, l'algorithme MASQH a révélé que la présence de thrombine n'impacte pas non plus l'homogénéité finale du caillot. Il est donc attendu que la vitesse de dégradation du

biomatériau *in vivo* soit inchangée.

L'étude a finalement mis en lumière les implications pratiques de ces résultats pour les chirurgiens, notamment en ce qui concerne la manipulation et l'injection du biomatériau pendant la chirurgie. La concentration de thrombine de 0.5 NIH/mL a été identifiée comme la formulation la plus prometteuse, permettant à la fois une coagulation rapide et une facilité de manipulation jusqu'à 6 minutes après réhydratation. Ce compromis fait de cette formulation la candidate idéale pour un développement clinique ultérieur. De plus, il a été montré *ex vivo* que l'adhérence du biomatériau aux tissus tendineux est affectée par la durée de contact du biomatériau avec le tendon et augmente plus rapidement lorsque la thrombine est présente, démontrant la pertinence d'utiliser cette nouvelle formulation du biomatériau pour une implantation en milieu humide. Ce développement *in vitro* et *ex vivo* a été réalisé avec du sang commercial de mouton.

La troisième étude examine *in vivo* l'application des implants CS-FIIa-PRP dans un modèle de réparation du tendon SST de la coiffe des rotateurs chez le lapin. Préalablement, la coagulation des implants CS-FIIa réhydratés dans PRP issu de sang commercial de lapin a été étudiée. Cela a permis de valider que la formulation contenant 0.5 NIH/mL de thrombine, optimisée avec du sang de mouton, est également optimale pour le sang de lapin.

Cette étude compare 3 groupes : le premier permettant d'analyser les tissus de réparation après 2 semaines, le deuxième après 4 semaines et le troisième après 3 mois. Chaque groupe est constitué de 6 animaux ayant une épaule réparée en présence de CS-FIIa-PRP et l'autre sans (épaule contrôle). Le nombre d'animaux par groupe a préalablement été déterminé sur base d'un test de puissance statistique considérant une puissance de 0.8 et un niveau de signification (alpha) de 0.1, et basé sur les résultats obtenus préalablement par Deprés-Tremblay *et al.* avec le biomatériaux CS-PRP pour une réparation de la coiffe des rotateurs chez le lapin [16].

Cette étude *in vivo* a démontré que, lorsqu'ils sont implantés durant la chirurgie de la coiffe des rotateurs chez le lapin, les implants CS-FIIa-PRP semblent accélérer l'amélioration des propriétés mécaniques structurelles et matérielles du tendon. Entre autres, les tests mécaniques ont montré des résultats similaires pour le côté témoin et le côté traité deux semaines après la chirurgie (augmentation moyenne de 35% du module dynamique pour le côté traité, non significative) mais des propriétés mécaniques améliorées pour le côté traité après quatre semaines (augmentation moyenne de 100% du module dynamique, p-valeur < 0.05). Cette différence diminue après trois mois (augmentation moyenne du module dynamique de 46%, p-valeur < 0.1), suggérant que l'action de l'implant s'exerce majoritairement lors des premières étapes de réparation. Cette amélioration précoce est en outre illustrée par une diminution de

17% de la surface transversale du tendon du tissu de réparation entre 2 et 4 semaines après la chirurgie pour l'épaule traitée, tandis que l'épaule contrôle présente une surface constante durant cette période, supérieure à celle des spécimens intacts. Les tendons traités présentent également une augmentation significative de la rigidité, du module de Young et d'autres propriétés mécaniques par rapport aux tendons contrôles, particulièrement entre 2 et 4 semaines après la chirurgie. Cette accélération des propriétés mécaniques suggère une accélération de la réparation tissulaire.

En outre, l'étude montre que les implants inhibent l'ossification hétérotopique (OH) dans le tissu tendineux, une complication courante après la chirurgie de la coiffe des rotateurs. La présence du biomatériau montre une diminution significative (p-valeur < 0.05) à la fois du volume total d'HO et du nombre de fragments après 3 mois.

Le biomatériau était présent jusqu'à quatre semaines après la chirurgie et semblait complètement dégradé après trois mois. Il n'a pas conduit à des effets indésirables tels que des infections ou des cicatrices excessives, indiquant la sécurité du traitement.

Cependant, malgré les effets positifs sur la réparation des tendons, l'étude a révélé que les implants n'influençaient pas significativement le remodelage osseux au niveau du canal créé durant la chirurgie. Une amélioration avait été observée lors d'une étude préalable (menée par Deprés-Tremblay *et al.* [16]) utilisant le biomatériau CS-PRP (sans thrombine) sur des lapins et était donc attendue également dans le cas du biomatériaux CS-FIIa-PRP. Un résumé des différences et similitudes entre cette étude et la notre est présenté au tableau 6.1.

Comparé à d'autres biomatériaux à base de CS et de dérivés sanguins développés dans la littérature, notre biomatériau CS-FIIa-PRP présente des améliorations similaires en matière de cicatrisation, notamment au niveau de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse et de la réponse inflammatoire. Ces résultats sont par exemples obtenus dans le cas de plaies profondes chez le rat par Mohammadi *et al.* (traitement à base de CS et de PRP) [93] et dans le cas d'ulcères diabétiques chez le rat par Zhang *et al.* (hydrogel injectable à base de chitosane carboxyméthylé, de sulfate de chondroïtine oxydé et de PRP) [97] et par Qian *et al.* (hydrogel injectable à base de chitosane, fibroïne de soie et PRP) [96]. Cependant, similairement aux résultats obtenus par Depré-Tremblay, plusieurs études observent des améliorations également au niveau de la réparation osseuse, comme l'étude de Javaid *et al.* sur la réparation de fractures osseuses chez le lapin (traitement à base de CS et de PRP ou de PRF) [90]. Une investigation plus profonde est donc requise pour comprendre pourquoi le biomatériaux CS-FIIa-PRP n'a pas mené à la régénération osseuse attendue et mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réparation.

Cepeandant, dans l'ensemble, les résultats *in vivo* préliminaires indiquent que les implants

CS-FIIa-PRP pourraient être un outil précieux pour améliorer les résultats chirurgicaux pour la réparation des tendons.

Tableau 6.1 Comparaison des résultats de l'étude de Deprés-Tremblay *et al.* [16] et de notre étude.

Aspect	**Étude de Deprés-Tremblay**	**Notre étude**	**Similitudes/Différences**
Design expérimental	Biomatériau CS-PRP. 1 animal au jour 7, 1 au jour 14, 9 à 2 mois	Biomatériau CS-FIIa-PRP. 6 animaux au jour 14, 6 au jour 28, 6 à 3 mois	Différence dans la taille des échantillons et les points temporels
Chondrogenèse	Observée au jour 7	Observée au jour 14	Similitude : chondrogenèse observée. Différence dans le moment d'apparition (plus précoce chez Deprés-Tremblay).
Inflammation	Observée au jour 7 et au jour 14 dans les épaules contrôle. 3 animaux sur 9 présentaient encore une inflammation à 2 mois	Observée dans toutes les épaules traitées au jour 14, et dans 4 sur 6 épaules au jour 28. Plus aucune inflammation observée à 3 mois.	L'inflammation persiste à 2 mois chez Deprés-Tremblay, mais disparaît complètement à 3 mois dans notre étude.
Cellularité et vascularisation	Cellularité et vascularisation augmentées	Cellularité et vascularisation augmentées	Similitude : augmentation de la cellularité et de la vascularisation aux différents temps d'observation.
Remodelage osseux	Les implants CS-PRP induisent un remodelage osseux à 2 mois (augmentation de la surface osseuse et de la connectivité dans le canal principal).	CS-FIIa-PRP n'induit pas de remodelage osseux	Différence : remodelage osseux induit par CS-PRP chez Deprés-Tremblay, alors que CS-FIIa-PRP ne montre aucun remodelage osseux.
Attachement macroscopique du tendon	Attachement macroscopique supérieur pour les épaules traitées au CS-PRP à 2 mois	Attachement macroscopique supérieur pour les épaules traitées avec CS-FIIa-PRP à 14 et 28 jours	Similitude : amélioration macroscopique de l'attachement du tendon.
Attachement microscopique du tendon	Attachement microscopique supérieur pour les épaules traitées avec CS-PRP à 2 mois	Pas de différence significative dans l'attachement microscopique à 2 mois pour CS-FIIa-PRP	Différence : amélioration microscopique observée chez Deprés-Tremblay, mais non retrouvée dans notre étude.
Site d'attachement anatomique	Site d'attachement anatomiquement plus correct pour les tendons traités que pour les contrôles est observé après 2 mois.	Site d'attachement anatomiquement plus correct pour les tendons traités que pour les contrôles après 3 mois.	Similitude : observation similaire d'un site d'attachement anatomiquement correct pour les tendons traités aux temps d'observation le plus long.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ensemble, ces trois études offrent un aperçu complet du développement et de l'application de biomatériaux pour la réparation des tissus mous.

D'une part, l'algorithme MASQH propose une approche novatrice pour quantifier l'homogénéité d'images, entre autres celles issues de coupes histologiques. Dans le contexte des implants CS-PRP, une quantification précise de l'homogénéité permet par exemple de comparer différentes formulations du biomatériau entre-elles, mais aussi de valider que pour chaque lot de biomatériau produit, le CS se mélange de façon homogène aux composés sanguins.

D'autre part, les biomatériaux à base de CS-FIIa lyophilisés et réhydratés dans du PRP, montrent un potentiel prometteur pour améliorer la réparation des tendons et réduire les complications telles que l'ossification hétérotopique, tout en étant faciles à intégrer dans le flux des chirurgies standards actuelles.

7.1 Synthèse des travaux

Les trois études présentées apportent des contributions significatives à la compréhension et au développement de biomatériaux avancés et de méthodes analytiques pour la réparation tissulaire, en particulier dans le domaine de la médecine régénératrice orthopédique.

La première étude a proposé une nouvelle définition de l'homogénéité et développé un algorithme innovant, MASQH, pour la quantifier dans les images. Cet algorithme, qui évite la segmentation des images, surmonte certaines des limitations des méthodes existantes, notamment en termes de simplicité, de versatilité et de robustesse. La méthode a été validée sur un large éventail d'images synthétiques et expérimentales, telles que des caillots hybrides CS-PRP et des nanocomposites, démontrant sa capacité à discriminer et classifier efficacement différentes situations. Ce travail ouvre la voie à une utilisation plus large de MASQH dans de nombreux domaines où l'homogénéité des images est un critère clé. De plus, l'application et le code MATLAB™ associés sont mis à disposition gratuitement pour encourager l'adoption de cette méthode.

La deuxième étude a validé deux hypothèses clés concernant les implants CS-PRP enrichis en thrombine (CS-FIIa-PRP). Premièrement, elle a démontré que la thrombine peut accélérer la solidification de ces implants, tout en les maintenant faciles à manipuler et injecter. Deuxièmement, elle a confirmé qu'il est possible d'ajouter la thrombine avant la lyophilisation sans compromettre la performance du biomatériau. Ces résultats prometteurs nous ont incité à

poursuivre les recherches au travers d'une étude animale présentée dans la troisième étude.

Cette troisième étude aborde le défi clinique persistant de la réparation de la coiffe des rotateurs. Chez le lapin, les résultats préliminaires ont montré que les implants CS-FIIa-PRP étaient bien retenus au site d'injection sans provoquer d'effets indésirables dans l'articulation. L'utilisation de ces implants, en combinaison avec des sutures transosseuses, a permis d'améliorer plus rapidement les propriétés mécaniques du tendon supra-épineux et de son attache à la tête humérale, tout en inhibant le développement de l'ossification hétérotopique. Toutefois, un impact était attendu sur le remodelage osseux, mais n'a pas été observé, soulignant la nécessité de recherches supplémentaires pour explorer ce domaine. Ces résultats confirment néanmoins le potentiel des implants CS-FIIa-PRP pour améliorer les résultats des chirurgies de la coiffe des rotateurs.

7.2 Limitations de la solution proposée

7.2.1 Algorithme MASQH

Bien que l'algorithme MASQH soit simple et robuste, permettant une classification précise des images, il présente certaines limites inhérentes à sa définition de l'homogénéité. Tout d'abord, les images à comparer doivent être acquises avec une taille et une méthode identiques, ce qui peut restreindre la flexibilité de l'algorithme. De plus, l'homogénéité est caractérisée par rapport à un paramètre d'intérêt spécifique, nécessitant l'utilisation d'un paramètre dépendant du champ d'analyse, comme le plus petit carré d'analyse. L'indice d'homogénéité issu d'une image ne peut être utilisé que comme mesure relative par rapport à des indices provenant d'images du même sujet ou du même champ d'application.

En outre, deux autres limitations concernent l'algorithme proposé : l'absence de segmentation, bien qu'augmentant la robustesse, réduit la spécificité. Par exemple, un objet d'intérêt placé sur un fond non homogène pourrait diminuer l'indice d'homogénéité final fourni par l'algorithme. Une segmentation précise et robuste permettrait d'améliorer cette spécificité. De plus, étant donné que l'homogénéité est fonction de l'échelle, toutes les sous-images comparées doivent être de même taille. Les carrés utilisés doivent donc être entièrement contenus dans l'image analysée, ce qui entraîne un effet de bord où les pixels situés au centre de l'image ont plus de chances d'être inclus dans une sous-image par rapport à ceux situés près des bords.

7.2.2 Développement et optimisation *in vitro* de biomatériaux CS-FIIa-PRP

Une limitation notable de cette étude est l'utilisation de sang de mouton pour investiguer un biomatériau destiné à être préparé avec du PRP humain et utilisé chez l'humain. Bien que le sang de mouton soit plus similaire au sang humain que celui de porc, de lapin ou de chien, des différences significatives dans la coagulation existent entre ces types de sang. En effet, la coagulation chez l'humain se déclenche plus tard et est plus lente par rapport au mouton. De plus, l'utilisation de la thrombine humaine avec du sang de mouton peut entraîner des interférences dans la réaction de coagulation. Il est donc anticipé que l'incorporation de la thrombine humaine dans le biomatériau aura un effet plus prononcé lorsqu'il sera utilisé avec du PRP humain.

7.2.3 Efficacité *in vivo* de biomatériaux CS-FIIa-PRP

Le modèle animal de lapin a été choisi en raison de la similarité de la réparation de la coiffe des rotateurs avec celle chez l'humain. De plus, il permet une collecte suffisante de sang pour le volume de PRP autologue nécessaire à la solubilisation des biomatériaux CS-FIIa lyophilisés. Cependant, aucun modèle animal ne réplique parfaitement les blessures et le processus de réparation chez l'humain. L'anatomie de l'épaule du lapin diffère de celle de l'humain et le modèle de déchirures aiguës utilisé est différent des déchirures chroniques dégénératives fréquemment observées chez l'humain. Une déchirure chronique de la coiffe des rotateurs est généralement associée à une dégénération du tendon et du muscle, ainsi qu'à une diminution de la vasculature et un remodelage osseux. En outre, la technique de réparation transosseuse utilisée dans l'étude ne comporte pas d'ancres de suture, contrairement à la chirurgie standard chez l'humain. L'activité postopératoire non restreinte de l'animal pourrait également avoir causé le détachement des sutures du tendon, entravant le processus de réparation. Il est également important de mentionner que seul des lapins adultes ont été utilisés, et que le résultats ne sont donc pas applicables à une population plus jeune. De plus, cette étude est à notre connaissance la première à réaliser des tests mécaniques non destructifs sur les tendons SSP des lapins avant de les utiliser pour l'histologie. Nous n'avons pas étudié si ces tests ont endommagé les tendons à l'échelle microscopique, modifiant ainsi la structure des tissus observés en histologie. Des études supplémentaires sont nécessaires pour étudier cette question.

7.3 Améliorations futures

Les recherches futures devraient continuer l'analyse *in vitro* et *in vivo* des biomatériaux CS-FIIa-PRP.

Des études *in vivo* supplémentaires devraient être réalisées pour examiner la solidification du biomatériau CS-FIIa réhydraté, cette fois-ci, avec du PRP humain et non animal. Elles permettront de déterminer l'activité optimale de la thrombine nécessaire pour une implantation du biomatériau en contexte clinique. Nous souhaitons également mener de plus longues études sur la stabilité du biomatériau à -20°C, 4°C et à température ambiante pour évaluer si l'activité de la thrombine est maintenue jusqu'à un an après sa lyophilisation. Une stabilité sur le long terme faciliterait l'adoption clinique du biomatériau.

Les futures études *in vivo* sur la coiffe des rotateurs devraient inclure 1) un nombre plus important d'animaux pour approfondir les tendances non significatives observées, 2) un groupe de sutures-PRP afin de distinguer l'effet des implants CS-FIIa-PRP par rapport au PRP seul, et 3) une étude plus approfondie du mécanisme d'action du biomatériau à travers des colorations immunohistologiques. De plus, notre équipe de recherche prévoit d'explorer le potentiel des biomatériaux CS-FIIa-PRP pour améliorer la réparation d'autres conditions orthopédiques, telles que les déchirures du ligament croisé antérieur (ACL), les défauts de cartilage, les déchirures du ménisque ou les ulcères du pied diabétique (DFU).

RÉFÉRENCES

[1] D. V. Chona *et al.*, "The timing of retears after arthroscopic rotator cuff repair," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 26, n°. 11, p. 2054–2059, 2017. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1058274617304366

[2] A. Chevrier *et al.*, "Injectable chitosan-platelet-rich plasma implants to promote tissue regeneration : in vitro properties, in vivo residence, degradation, cell recruitment and vascularization," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 12, n°. 1, p. 217–228, 2018. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1002/term.2403

[3] R. C. Cheung *et al.*, "Chitosan : An update on potential biomedical and pharmaceutical applications," *Mar Drugs*, vol. 13, n°. 8, p. 5156–86, 2015. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287217

[4] I. A. Duceac *et al.*, "All-polysaccharide hydrogels for drug delivery applications : Tunable chitosan beads surfaces via physical or chemical interactions, using oxidized pullulan," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 181, p. 1047–1062, 2021. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021008965

[5] N. Desai *et al.*, "Chitosan : A potential biopolymer in drug delivery and biomedical applications," *Pharmaceutics*, vol. 15, n°. 4, p. 1313, 2023.

[6] C. Hoemann et D. Fong, *Immunological responses to chitosan for biomedical applications*. Elsevier, 2017, p. 45–79.

[7] V. Patrulea *et al.*, "Chitosan as a starting material for wound healing applications," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 97, p. 417–426, 2015. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641115003367

[8] K. Wang *et al.*, "Evaluation of new film based on chitosan/gold nanocomposites on antibacterial property and wound-healing efficacy," *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2020, p. 1–10, 2020.

[9] I. Bano *et al.*, "Chitosan : A potential biopolymer for wound management," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 102, p. 380–383, 2017. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017308024

[10] S. G. Kou, L. Peters et M. Mucalo, "Chitosan : A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms," *Carbohydrate Polymers*, vol. 282, p. 119132, 2022.

[11] H. Lai *et al.*, "Research trends on platelet-rich plasma in the treatment of wounds during 2002–2021 : A 20-year bibliometric analysis," *International Wound Journal*, 2022.

[12] V. Pavlovic *et al.*, "Platelet rich plasma : a short overview of certain bioactive components," *Open Medicine*, vol. 11, n°. 1, p. 242–247, 2016.

[13] A. C. Thu, "The use of platelet-rich plasma in management of musculoskeletal pain : a narrative review," *Journal of Yeungnam Medical Science*, vol. 39, n°. 3, p. 206–215, 2022.

[14] H. H. Lu *et al.*, "Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation," *Journal of Biomedical Materials Research Part A : An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 86, n°. 4, p. 1128–1136, 2008. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18181109

[15] M. N. Popescu *et al.*, "Autologous platelet-rich plasma efficacy in the field of regenerative medicine : product and quality control," *BioMed Research International*, vol. 2021, p. 1–6, 2021.

[16] G. Depres-Tremblay *et al.*, "Freeze-dried chitosan-platelet-rich plasma implants improve supraspinatus tendon attachment in a transosseous rotator cuff repair model in the rabbit," *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 33, n°. 6, p. 792–807, 2019.

[17] A. Chevrier *et al.*, "Freeze-dried chitosan solubilized in platelet-rich plasma in a sheep model of rotatoe cuff repair," *Orthopaedic Proceedings*, vol. 102-B, n°. SUPP_6, p. 57–57, 2020. [En ligne]. Disponible : https://online.boneandjoint.org.uk/doi/abs/10.1302/1358-992X.2020.6.057

[18] G. Dwivedi *et al.*, "Injectable freeze-dried chitosan-platelet-rich-plasma implants improve marrow-stimulated cartilage repair in a chronic-defect rabbit model," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 13, n°. 4, p. 599–611, 2019. [En ligne]. Disponible : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.2814

[19] F. Milano *et al.*, "Robust segmentation-free algorithm for homogeneity quantification in images," *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 30, p. 5533–5544, 2021.

[20] A. M. Hayes, M. M. Herning et C. Gonzalez-Snyder, "Chapter 8 - musculoskeletal system," dans *Occupational Therapy with Aging Adults*, K. F. Barney, C. Emerita et M. A. Perkinson, édit. Mosby, 2016, p. 97–124. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323067768000177

[21] N. A. of Sciences *et al.*, *Selected health conditions and likelihood of improvement with treatment*. Washington, DC : National Academies Press, 2020.

[22] V. Ponkilainen *et al.*, “The incidence of musculoskeletal injuries : a systematic review and meta-analysis,” *Bone & Joint Research*, vol. 11, n°. 11, p. 814–825, 2022. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1302/2046-3758.1111.BJR-2022-0181.R1

[23] T. Teunis *et al.*, “A systematic review and pooled analysis of the prevalence of rotator cuff disease with increasing age,” *Journal of shoulder and elbow surgery*, vol. 23, n°. 12, p. 1913–1921, 2014. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25441568

[24] E. Luvsannyam *et al.*, “Meniscus tear : pathology, incidence, and management,” *Cureus*, vol. 14, n°. 5, 2022.

[25] M. Steinwachs, L. Engebretsen et R. Brophy, “Scientific evidence base for cartilage injury and repair in the athlete,” *Cartilage*, vol. 3, n°. 1_suppl, p. 11S–17S, 2012.

[26] A. H. Gomoll *et al.*, “Rotator cuff disorders : recognition and management among patients with shoulder pain,” *Arthritis & rheumatism*, vol. 50, n°. 12, p. 3751–3761, 2004.

[27] C. Braune *et al.*, “Mid-term results and quantitative comparison of postoperative shoulder function in traumatic and non-traumatic rotator cuff tears,” *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, vol. 123, p. 419–424, 2003.

[28] G. Deprés-Tremblay *et al.*, “Rotator cuff repair : a review of surgical techniques, animal models, and new technologies under development,” *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 25, n°. 12, p. 2078–2085, 2016. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27554609

[29] S. Maruvada et M. Varacallo, “Anatomy, rotator cuff,” *Europe PMC*, 2017.

[30] “Bethesda (md) : National library of medicine (us) ; normal rotator cuff anatomy,” 2019. [En ligne]. Disponible : https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19901.htm

[31] “Bethesda (md) : National library of medicine (us) ; rotator cuff muscles,” 2023. [En ligne]. Disponible : https://medlineplus.gov/ency/imagepages/19622.htm

[32] J. C. Seida *et al.*, “Systematic review : nonoperative and operative treatments for rotator cuff tears,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 153, n°. 4, p. 246–255, 2010. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621893

[33] J.-Y. Park, K.-T. Chung et M.-J. Yoo, “A serial comparison of arthroscopic repairs for partial-and full-thickness rotator cuff tears,” *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 20, n°. 7, p. 705–711, 2004. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15346112

[34] R. Crusher, “Rotator cuff injuries,” *Accident and emergency nursing*, vol. 8, n°. 3, p. 129–133, 2000. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

10893553

[35] U. G. Longo *et al.*, "Histopathology of rotator cuff tears," *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, vol. 19, n°. 3, p. 227–236, 2011. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822106

[36] P. Spall, D. C. Ribeiro et G. Sole, "Electromyographic activity of shoulder girdle muscles in patients with symptomatic and asymptomatic rotator cuff tears : a systematic review and meta-analysis," *PM&R*, vol. 8, n°. 9, p. 894–906, 2016. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26972361

[37] J.-F. Kaux et J.-M. Crielaard, "Tendon et tendinopathie," *Journal de Traumatologie du Sport*, vol. 31, n°. 4, p. 235–240, 2014.

[38] J. H. C. Wang et B. P. Thampatty, *Chapter 5 - Advances in tendon mechanobiology*. Academic Press, 2018, p. 127–155. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128129524000052

[39] M. Meeremans *et al.*, "The lack of a representative tendinopathy model hampers fundamental mesenchymal stem cell research," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, p. 651164, 2021.

[40] L. V. Gulotta et S. A. Rodeo, "Growth factors for rotator cuff repair," *Clinics in sports medicine*, vol. 28, n°. 1, p. 13–23, 2009.

[41] J. Apostolakos *et al.*, "The enthesis : a review of the tendon-to-bone insertion," *Muscles, ligaments and tendons journal*, vol. 4, n°. 3, p. 333, 2014.

[42] A. H. Lebaschi *et al.*, "Biomechanical, histologic, and molecular evaluation of tendon healing in a new murine model of rotator cuff repair," *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 34, n°. 4, p. 1173–1183, 2018. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29459078

[43] J. Carpenter *et al.*, "Rotator cuff defect healing : a biomechanical and histologic analysis in an animal model," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 7, n°. 6, p. 599–605, 1998. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9883420

[44] G. Trudel *et al.*, "Adipocyte hyperplasia : the primary mechanism of supraspinatus intramuscular fat accumulation after a complete rotator cuff tendon tear : a study in the rabbit," *Adipocyte*, vol. 8, n°. 1, p. 144–153, 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31033395

[45] P. Sharma et N. Maffulli, "Basic biology of tendon injury and healing," *The surgeon*, vol. 3, n°. 5, p. 309–316, 2005.

[46] P. Sharma, N. Maffulli *et al.*, "Biology of tendon injury : healing, modeling and remodeling," *Journal of musculoskeletal and neuronal interactions*, vol. 6, n°. 2, p. 181,

2006.

[47] G. K. Reddy, L. Stehno-Bittel et C. S. Enwemeka, "Matrix remodeling in healing rabbit achilles tendon," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 7, n°. 6, p. 518–527, 1999.

[48] P. G. Murphy *et al.*, "Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types i and iii by explants of normal and healing rabbit ligaments," *Biochemistry and cell biology*, vol. 72, n°. 9-10, p. 403–409, 1994.

[49] W. R. Frontera, *Rehabilitation of sports injuries : scientific basis*. John Wiley & Sons, 2008.

[50] N. Maffulli et F. Benazzo, "Basic science of tendons," *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, vol. 8, n°. 1, p. 1–5, 2000.

[51] F. Oliva, A. G. Via et N. Maffulli, "Role of growth factors in rotator cuff healing," *Sports medicine and arthroscopy review*, vol. 19, n°. 3, p. 218–226, 2011.

[52] C. Hooley et R. Cohen, "A model for the creep behaviour of tendon," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 1, n°. 3, p. 123–132, 1979.

[53] S.-O. Abrahamsson, "Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. experimental studies on rabbit tendon." *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery. Supplementum*, vol. 23, p. 1–51, 1991.

[54] D. AMIEL *et al.*, "Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen : A comparison between nine-and 12-week immobilization," *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, vol. 172, p. 265–270, 1983.

[55] N. Maffulli, H. Moller et C. Evans, "Tendon healing : can it be optimised ?" *British journal of sports medicine*, vol. 36, n°. 5, p. 315–316, 2002.

[56] M. Lin *et al.*, "Growth factors in the treatment of achilles tendon injury," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 11, p. 1250533, 2023.

[57] R. H. Gelberman *et al.*, "Flexor tendon repair in vitro : a comparative histologic study of the rabbit, chicken, dog, and monkey," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 2, n°. 1, p. 39–48, 1984.

[58] M. Fujita, S. Hukuda et Y. Doida, "Experimental study of intrinsic healing of the flexor tendon : collagen synthesis of the cultured flexor tendon cells of the canine," *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, vol. 66, n°. 4, p. 326–333, 1992.

[59] T. J. Koob et A. P. Summers, "Tendon—bridging the gap," p. 905–909, 2002.

[60] H. K. Uhthoff et K. Sarkar, "Surgical repair of rotator cuff ruptures. the importance of the subacromial bursa," *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, vol. 73, n°. 3, p. 399–401, 1991.

[61] S. JW, "Flexor tendons-acute injuries," *Green's operative hand surgery*, p. 1851–1897, 1999.

[62] T. J. Koob, "Biomimetic approaches to tendon repair," *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, vol. 133, n°. 4, p. 1171–1192, 2002.

[63] P. A. Everts *et al.*, "Platelet-rich plasma and platelet gel : a review," *The Journal of extracorporeal technology*, vol. 38, n°. 2, p. 174–187, 2006.

[64] E. Itoi, "Rotator cuff tear : physical examination and conservative treatment," *Journal of Orthopaedic Science*, vol. 18, n°. 2, p. 197–204, 2013. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306597

[65] J. Hsu et J. D. Keener, "Natural history of rotator cuff disease and implications on management," *Operative techniques in orthopaedics*, vol. 25, n°. 1, p. 2–9, 2015. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26726288

[66] N. S. Ghodadra *et al.*, "Open, mini-open, and all-arthroscopic rotator cuff repair surgery : indications and implications for rehabilitation," *journal of orthopaedic & sports physical therapy*, vol. 39, n°. 2, p. 81–A6, 2009. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194025

[67] C.-H. Cho *et al.*, "Anterolateral approach for mini-open rotator cuff repair," *International orthopaedics*, vol. 36, n°. 1, p. 95–100, 2012. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21717201

[68] K. Lindley et G. L. Jones, "Outcomes of arthroscopic versus open rotator cuff repair : a systematic review of the literature," *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, vol. 39, n°. 12, p. 592–600, 2010. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720577

[69] M. Rashid, "Augmentation strategies in rotator cuff repair," Thesis, University of Oxford, 2018.

[70] C. H. Jo *et al.*, "Platelet-rich plasma for arthroscopic repair of large to massive rotator cuff tears : a randomized, single-blind, parallel-group trial," *The American journal of sports medicine*, vol. 41, n°. 10, p. 2240–2248, 2013.

[71] V. Y. Moraes *et al.*, "Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n°. 4, 2014.

[72] Y.-S. Kim *et al.*, "Survivorship of implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in acute rotator cuff tear," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 22, n°. 8, p. 1037–1045, 2013.

[73] S. Yokoya *et al.*, "Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow–derived mesenchymal stem cells in a rabbit model," *The American journal of sports medicine*, vol. 40, n°. 6, p. 1259–1268, 2012.

[74] S. Patel *et al.*, "Advances in biologic augmentation for rotator cuff repair," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1383, n°. 1, p. 97, 2016.

[75] H. M. Kim *et al.*, "The role of transforming growth factor beta isoforms in tendon-to-bone healing," *Connective tissue research*, vol. 52, n°. 2, p. 87–98, 2011.

[76] T. Funakoshi *et al.*, "Rotator cuff regeneration using chitin fabric as an acellular matrix," *J Shoulder Elbow Surg*, vol. 15, n°. 1, p. 112–8, 2006.

[77] E. Melamed, B. Beutel et D. Robinson, "Enhancement of acute tendon repair using chitosan matrix," *Am J Orthop.*, vol. 44, n°. 5, p. 212–216, 2015.

[78] D. Robinson *et al.*, "The use of a chitosan-based hyaluronate gel in musculoskeletal afflictions," *Proceedings - 2nd Advanced Technologies for Enhanced Quality of Life, ATEQUAL 2010*, 2010.

[79] J. L. Bond *et al.*, "Arthroscopic replacement of massive, irreparable rotator cuff tears using a graftjacket allograft : technique and preliminary results," *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 24, n°. 4, p. 403–e1, 2008.

[80] M. H. Metcalf, F. H. Savoie III et B. Kellum, "Surgical technique for xenograft (sis) augmentation of rotator-cuff repairs," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 12, n°. 3, p. 204–208, 2002.

[81] H. Yi *et al.*, "Biofabrication with chitosan," *Biomacromolecules*, vol. 6, n°. 6, p. 2881–2894, 2005.

[82] P. K. Dutta, J. Dutta et V. Tripathi, "Chitin and chitosan : Chemistry, properties and applications," *Journal of Scientific & Industrial Research*, vol. 63, n°. 1, p. 20–31, 2004. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000188005100002

[83] B. M. Chesnutt *et al.*, "Composite chitosan/nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts in vitro and support bone formation in vivo," *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, n°. 9, p. 2571–2579, 2009.

[84] P. J. VandeVord *et al.*, "Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice," *Journal of Biomedical Materials Research : An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, vol. 59, n°. 3, p. 585–590, 2002.

[85] C. D. Hoemann *et al.*, "Scaffold-guided subchondral bone repair : implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages," *The American journal*

of sports medicine, vol. 38, nº. 9, p. 1845–1856, 2010.

[86] G. Depres-Tremblay *et al.*, "Freeze-dried chitosan-platelet-rich plasma implants for rotator cuff tear repair : pilot ovine studies," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 4, nº. 11, p. 3737–3746, 2017.

[87] A. Chevrier *et al.*, "Freeze-dried chitosan solubilized in platelet-rich plasma in a sheep model of rotator cuff repair," dans *Orthopaedic Proceedings*, vol. 102, nº. SUPP_6. Bone & Joint, 2020, p. 57–57.

[88] A. Chevrier, M. B. Hurtig et M. Lavertu, "Chitosan–platelet-rich plasma implants improve rotator cuff repair in a large animal model : pivotal study," *Pharmaceutics*, vol. 13, nº. 11, p. 1955, 2021.

[89] S. Gan *et al.*, "Lyophilized platelet-rich fibrin exudate-loaded carboxymethyl chitosan/gelma hydrogel for efficient bone defect repair," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 15, nº. 22, p. 26 349–26 362, 2023.

[90] S. Javaid *et al.*, "Comparative biochemical analysis of platelet-rich plasma-chitosan and platelet-rich fibrin-chitosan for treating tibial bone defects in rabbits," *Veterinary World*, vol. 17, nº. 9, p. 2036, 2024.

[91] A. Rastegar *et al.*, "Platelet-rich fibrin-loaded pcl/chitosan core-shell fibers scaffold for enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Carbohydrate Polymers*, vol. 269, p. 118351, 2021.

[92] W. Pan *et al.*, "Prp-chitosan thermoresponsive hydrogel combined with black phosphorus nanosheets as injectable biomaterial for biotherapy and phototherapy treatment of rheumatoid arthritis," *Biomaterials*, vol. 239, p. 119851, 2020.

[93] R. Mohammadi *et al.*, "Effect of platelet rich plasma combined with chitosan biodegradable film on full-thickness wound healing in rat model," *Bulletin of Emergency & Trauma*, vol. 4, nº. 1, p. 29, 2016.

[94] Y.-N. Wu *et al.*, "Dual effect of chitosan activated platelet rich plasma (cprp) improved erectile function after cavernous nerve injury," *Journal of the Formosan Medical Association*, vol. 121, nº. 1, p. 14–24, 2022.

[95] B. Yuan *et al.*, "Platelet-rich plasma gel-loaded collagen/chitosan composite film accelerated rat sciatic nerve injury repair," *ACS omega*, vol. 8, nº. 3, p. 2931–2941, 2023.

[96] Z. Qian *et al.*, "Improving chronic diabetic wound healing through an injectable and self-healing hydrogel with platelet-rich plasma release," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 12, nº. 50, p. 55 659–55 674, 2020.

[97] Y. Zhang *et al.*, "An extracellular matrix-inspired self-healing composite hydrogel for enhanced platelet-rich plasma-mediated chronic diabetic wound treatment," *Carbohy-*

drate Polymers, vol. 315, p. 120973, 2023.

[98] Amplitude sweeps. [En ligne]. Disponible : https://wiki.anton-paar.com/ca-en/amplitude-sweeps/

[99] J. W. Heemskerk, E. M. Bevers et T. Lindhout, "Platelet activation and blood coagulation," *Thrombosis haemostasis*, vol. 88, n°. 08, p. 186–193, 2002. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195687

[100] M. Hoffman et D. M. Monroe III, "A cell-based model of hemostasis," *Thrombosis and haemostasis*, vol. 85, n°. 06, p. 958–965, 2001.

[101] A. P. Owens III et N. Mackman, "Tissue factor and thrombosis : The clot starts here," *Thrombosis and haemostasis*, vol. 104, n°. 3, p. 432, 2010.

[102] V. Kumar *et al.*, *Pathologic Basis of Disease*. Elsevier health sciences, 2014, p. 118–120.

[103] A. S. Wolberg, "Thrombin generation and fibrin clot structure," *Blood Reviews*, vol. 21, n°. 3, p. 131–142, 2007. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X0600066X

[104] S. Palta, R. Saroa et A. Palta, "Overview of the coagulation system," *Indian journal of anaesthesia*, vol. 58, n°. 5, p. 515, 2014. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25535411

[105] C. Marchand *et al.*, "Solidification mechanisms of chitosan–glycerol phosphate/blood implant for articular cartilage repair," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 17, n°. 7, p. 953–960, 2009. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458408003786

[106] ——, "Microdrilled cartilage defects treated with thrombin-solidified chitosan/blood implant regenerate a more hyaline, stable, and structurally integrated osteochondral unit compared to drilled controls," *Tissue Engineering Part A*, vol. 18, n°. 5-6, p. 508–519, 2011. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0178

[107] Q.-D. Zhang *et al.*, "Thrombin and thrombin-incorporated biomaterials for disease treatments," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 13, n°. 5, p. 2302209, 2024.

[108] C. Davidson, E. Tuddenham et J. McVey, "450 million years of hemostasis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, n°. 7, p. 1487–1494, 2003.

[109] M. A. Cunningham *et al.*, "Tissue factor and factor viia receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages," *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, vol. 94, n°. 10, p. 3413–3420, 1999.

[110] L. Rao et U. Pendurthi, "Regulation of tissue factor coagulant activity on cell surfaces," *Journal of thrombosis and haemostasis*, vol. 10, n°. 11, p. 2242–2253, 2012.

[111] R. Koomägi et M. Volm, "Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry : correlation between tissue factor and angiogenesis," *International journal of cancer*, vol. 79, n°. 1, p. 19–22, 1998.

[112] S. P. Grover et N. Mackman, "Tissue factor : an essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 38, n°. 4, p. 709–725, 2018.

[113] J. W. Weisel et R. I. Litvinov, *Fibrin formation, structure and properties.* Springer, 2017, p. 405–456.

[114] R. M. Haralick, "Statistical and structural approaches to texture," *Proceedings of the IEEE*, vol. 67, n°. 5, p. 786–804, 1979.

[115] F. Tomita, M. Yachida et S. Tsuji, "Detection of homogeneous regions by structural analysis," dans *IJCAI*, 1973, Conference Proceedings, p. 564–571.

[116] A. Baddeley, E. Rubak et R. Turner, *Intensity*, 1er éd. New York : Chapman and Hall/CRC, 2016, book section 6, p. 159–161.

[117] K. A. Derwin *et al.*, "Assessment of the canine model of rotator cuff injury and repair," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 16, n°. 5, Supplement, p. S140–S148, 2007. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1058274607002315

[118] D. Sonnabend et A. Young, "Comparative anatomy of the rotator cuff," *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 91, n°. 12, p. 1632–1637, 2009.

[119] L. J. Soslowsky *et al.*, "Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease," *Journal of shoulder and elbow surgery*, vol. 5, n°. 5, p. 383–392, 1996.

[120] L. Edelstein, S. Thomas et L. Soslowsky, "Rotator cuff tears : what have we learned from animal models," *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 11, n°. 2, p. 150–162, 2011. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000291698500009

[121] E. J. Kramer *et al.*, "Evaluation of cartilage degeneration in a rat model of rotator cuff tear arthropathy," *Journal of shoulder and elbow surgery*, vol. 22, n°. 12, p. 1702–1709, 2013. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000327486500022

[122] R. Gupta et T. Q. Lee, "Contributions of the different rabbit models to our understanding of rotator cuff pathology," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 16, n°. 5, Supplement, p. S149–S157, 2007. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1058274607003230

[123] X. Liu *et al.*, "A rat model of massive rotator cuff tears," *Journal of orthopaedic research*, vol. 29, n°. 4, p. 588–595, 2011.

[124] W. Zhao *et al.*, "Animal models of rotator cuff injury and repair : a systematic review," *Tissue Engineering Part B : Reviews*, vol. 28, n°. 6, p. 1258–1273, 2022.

[125] K. Rowshan *et al.*, "Development of fatty atrophy after neurologic and rotator cuff injuries in an animal model of rotator cuff pathology," *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume.*, vol. 92, n°. 13, p. 2270, 2010.

[126] S. Thomopoulos *et al.*, "Mechanisms of tendon injury and repair," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 33, n°. 6, p. 832–839, 2015.

[127] K. Li *et al.*, "Development of a rabbit chronic-like rotator cuff injury model for study of fibrosis and muscular fatty degeneration," *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n°. 193, p. e64828, 2023.

[128] X. Yan, *Chitosan for tendon engineering and regeneration*. Elsevier, 2017, p. 73–87.

[129] S. P. Lake *et al.*, "Tensile properties and fiber alignment of human supraspinatus tendon in the transverse direction demonstrate inhomogeneity, nonlinearity, and regional isotropy," *Journal of biomechanics*, vol. 43, n°. 4, p. 727–732, 2010.

[130] M. Conti, V. Danese et V. Pata, "Aging of viscoelastic materials : A mathematical model," dans *Mathematical Modeling in Cultural Heritage : MACH2019*. Springer, 2021, p. 135–146.

[131] Z. M. Beach, D. J. Gittings et L. J. Soslowsky, "Tendon biomechanics," *Muscle and Tendon Injuries : Evaluation and Management*, p. 15–22, 2017.

[132] R. F. Ker, "Mechanics of tendon, from an engineering perspective," *International Journal of Fatigue*, vol. 29, n°. 6, p. 1001–1009, 2007. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000246346300003

[133] M. Scholze *et al.*, "Utilization of 3d printing technology to facilitate and standardize soft tissue testing," *Scientific reports*, vol. 8, n°. 1, p. 1–13, 2018. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30054509

[134] S. P. Lake *et al.*, "Tensile properties and fiber alignment of human supraspinatus tendon in the transverse direction demonstrate inhomogeneity, nonlinearity, and regional isotropy," *Journal of Biomechanics*, vol. 43, n°. 4, p. 727–732, 2010. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929009005910

[135] L. Chen *et al.*, "Laboratory testing on energy absorption of high-damping rubber in a new bolt for preventing rockburst in deep hard rock mass," *Shock and vibration*, vol. 2018, n°. 1, p. 7214821, 2018.

[136] B. R. Freedman *et al.*, "Biomechanical and structural response of healing achilles tendon to fatigue loading following acute injury," *Journal of biomechanics*, vol. 47, n°. 9, p. 2028–2034, 2014.

[137] D. T. Fung *et al.*, "Subrupture tendon fatigue damage," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 27, n°. 2, p. 264–273, 2009.

[138] S. P. Lake *et al.*, "Guidelines for ex vivo mechanical testing of tendon," *Journal of Orthopaedic Research®*, vol. 41, n°. 10, p. 2105–2113, 2023.

[139] A. S. LaCroix *et al.*, "Relationship between tendon stiffness and failure : a metaanalysis," *Journal of Applied Physiology*, vol. 115, n°. 1, p. 43–51, 2013.

[140] W. M. S. Russell et R. L. Burch, *The principles of humane experimental technique*. Methuen, 1959.

[141] N. Nagra *et al.*, "Mechanical properties of all-suture anchors for rotator cuff repair," *Bone & Joint Research*, vol. 6, n°. 2, p. 82–89, 2017. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28167489

[142] F. Fang, A. S. Sawhney et S. P. Lake, "Different regions of bovine deep digital flexor tendon exhibit distinct elastic, but not viscous, mechanical properties under both compression and shear loading," *Journal of biomechanics*, vol. 47, n°. 12, p. 2869–2877, 2014.

[143] S.-B. Lee *et al.*, "The bursal and articular sides of the supraspinatus tendon have a different compressive stiffness," *Clinical Biomechanics*, vol. 15, n°. 4, p. 241–247, 2000. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000085470600004

[144] S. P. Lake *et al.*, "Effect of fiber distribution and realignment on the nonlinear and inhomogeneous mechanical properties of human supraspinatus tendon under longitudinal tensile loading," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 27, n°. 12, p. 1596–1602, 2009.

[145] E. Itoi *et al.*, "Tensile properties of the supraspinatus tendon," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 13, n°. 4, p. 578–584, 1995.

[146] M. J. Bey *et al.*, "Intratendinous strain fields of the intact supraspinatus tendon : the effect of glenohumeral joint position and tendon region," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 20, n°. 4, p. 869–874, 2002.

[147] M. D. Newton *et al.*, "The influence of testing angle on the biomechanical properties of the rat supraspinatus tendon," *Journal of Biomechanics*, vol. 49, n°. 16, p. 4159–4163, 2016. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929016311617

[148] S. P. Lake, "Anisotropic, inhomogeneous and nonlinear structure-function of human supraspinatus tendon," Thesis, University of Pennsylvania, 2009.

[149] T. Luyckx *et al.*, "Digital image correlation as a tool for three-dimensional strain analysis in human tendon tissue," *Journal of experimental orthopaedics*, vol. 1, n°. 1, p. 7,

2014.

[150] S. S. Burkhart *et al.*, "Cyclic loading of anchor-based rotator cuff repairs : confirmation of the tension overload phenomenon and comparison of suture anchor fixation with transosseous fixation," *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 13, n°. 6, p. 720–724, 1997.

[151] D. L. Butler, N. Juncosa et M. R. Dressler, "Functional efficacy of tendon repair processes," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 6, p. 303–329, 2004.

[152] B. K. Connizzo et A. J. Grodzinsky, "Multiscale poroviscoelastic compressive properties of mouse supraspinatus tendons are altered in young and aged mice," *Journal of biomechanical engineering*, vol. 140, n°. 5, 2018. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29238818

[153] F. Chen *et al.*, "Exploring digital image correlation technique for the analysis of the tensile properties of all-cellulose composites," *Cellulose*, vol. 28, p. 4165–4178, 2021.

[154] F. F. Safadi *et al.*, "Bone structure, development and bone biology," *Bone pathology*, p. 1–50, 2009.

[155] J. Banks, "Applied veterinary histology 3 rd edition," 1993.

[156] V. Toppets *et al.*, "Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux," *Ann Med Vet*, vol. 148, p. 1–13, 2004.

[157] O. Lepage, M. Perron-Lepage et R. François, "Description histologique de l'os normal chez le poney shetland," *Prat. Vet. Eq*, vol. 28, p. 269–277, 1996.

[158] B. Alberts *et al.*, "Jonctions cellulaires, adhérence cellulaire et matrice extracellulaire (pp 949-1009)," *Biologie moléculaire de la cellule*, vol. 3, 1995.

[159] S. Ghimire *et al.*, "The investigation of bone fracture healing under intramembranous and endochondral ossification," *Bone Reports*, vol. 14, p. 100740, 2021. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352187220305003

[160] A. Bigham-Sadegh et A. Oryan, "Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures," *International wound journal*, vol. 12, n°. 3, p. 238–247, 2015.

[161] A. Salhotra *et al.*, "Mechanisms of bone development and repair," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 21, n°. 11, p. 696–711, 2020.

[162] H. Ben *et al.*, "Prevalence, timing, locational distribution, and risk factors for heterotopic ossification after elbow arthroscopy," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 51, n°. 13, p. 3401–3408, 2023.

[163] Q. Zhang *et al.*, "Heterotopic ossification of tendon and ligament," *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 24, n°. 10, p. 5428–5437, 2020.

[164] A. T. Qureshi *et al.*, “Early characterization of blast-related heterotopic ossification in a rat model,” *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, vol. 473, n°. 9, p. 2831–2839, 2015.

[165] C. T. Kraft *et al.*, “Trauma-induced heterotopic bone formation and the role of the immune system : a review,” *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, vol. 80, n°. 1, p. 156–165, 2016.

[166] F. Torossian *et al.*, “Macrophage-derived oncostatin m contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications,” *JCI insight*, vol. 2, n°. 21, 2017.

[167] M. Joice, G. Vasileiadis et D. Amanatullah, “Non-steroidal anti-inflammatory drugs for heterotopic ossification prophylaxis after total hip arthroplasty : a systematic review and meta-analysis,” *The bone & joint journal*, vol. 100, n°. 7, p. 915–922, 2018.

[168] X. Liu *et al.*, “Mechanical tension promotes the osteogenic differentiation of rat tendon-derived stem cells through the wnt5a/wnt5b/jnk signaling pathway,” *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 36, n°. 2, p. 517–530, 2015.

[169] A. K. Huber *et al.*, “Immobilization after injury alters extracellular matrix and stem cell fate,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 130, n°. 10, p. 5444–5460, 2020.

[170] J. Kircher, V. Martinek et W. Mittelmeier, “Heterotopic ossification after minimally invasive rotator cuff repair,” *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 23, n°. 12, p. 1359–e1, 2007.

[171] N. Angrisani *et al.*, “Histology of tendon and enthesis—suitable techniques for specific research questions,” *Eur. Cell Mater*, vol. 24, p. 228–251, 2022.

[172] C. Hoemann *et al.*, “Chitosan–glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects,” *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 15, n°. 1, p. 78–89, 2007. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895758

[173] W.-H. Zimmermann *et al.*, “Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct,” *Circulation research*, vol. 90, n°. 2, p. 223–230, 2002. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834716

[174] J. Chen *et al.*, “Improvement of in vitro three-dimensional cartilage regeneration by a novel hydrostatic pressure bioreactor,” *Stem cells translational medicine*, vol. 6, n°. 3, p. 982–991, 2017. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28297584

[175] C. Del Gaudio et G. A. Licciardi, “A simple tool for two-dimensional quantification of filler dispersion : A proposal,” *Fullerenes, Nanotubes and*

Carbon Nanostructures, vol. 27, n°. 5, p. 446–452, 2019. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1080/1536383X.2019.1594199

[176] H. Khare et D. Burris, "A quantitative method for measuring nanocomposite dispersion," *Polymer*, vol. 51, n°. 3, p. 719–729, 2010. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000274281200017

[177] B. Luo *et al.*, "Homogeneity quantification of nanoparticles dispersion in composite materials," *Polymer Composites*, vol. 40, n°. 3, p. 1000–1005, 2019.

[178] P. Rossi *et al.*, "Quantitative assessment of the reinforcement distribution homogeneity in cnt/metal composites," *Advanced Engineering Materials*, vol. 17, n°. 7, p. 1017–1021, 2015. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000357680700012

[179] P. Belhomme *et al.*, "Heterogeneity assessment of histological tissue sections in whole slide images," *Computerized Medical Imaging and Graphics*, vol. 42, p. 51–55, 2015. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0895611114001815

[180] P. J. Keller *et al.*, "Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines," *Breast cancer research*, vol. 12, n°. 5, p. R87, 2010. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20964822

[181] A. Belsare et M. Mushrif, "Histopathological image analysis using image processing techniques : An overview," *Signal & Image Processing*, vol. 3, n°. 4, p. 23, 2012.

[182] L. Ballerini et L. J. s. Bocchi, "Genetic programming for prediction of fat content in meat images," *Science*, vol. 11, p. 12, 2006.

[183] T. Brosnan et D.-W. Sun, "Improving quality inspection of food products by computer vision—a review," *Journal of food engineering*, vol. 61, n°. 1, p. 3–16, 2004.

[184] T. Kashiwagi *et al.*, "Relationship between dispersion metric and properties of pmma/swnt nanocomposites," *Polymer*, vol. 48, n°. 16, p. 4855–4866, 2007. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000248860400026

[185] S. Basu *et al.*, "Transmission electron microscopy based direct mathematical quantifiers for dispersion in nanocomposites," *Applied Physics Letters*, vol. 91, n°. 5, p. 053105, 2007.

[186] Z. Li *et al.*, "The quantitative characterization of the concentration and dispersion of multi-walled carbon nanotubes in suspension by spectrophotometry," *Nanotechnology*, vol. 17, n°. 15, p. 3692, 2006.

[187] P. T. Lillehei *et al.*, "A quantitative assessment of carbon nanotube dispersion in polymer matrices," *Nanotechnology*, vol. 20, n°. 32, p. 325708, 2009.

[188] Z. Luo et J. Koo, “Quantifying the dispersion of mixture microstructures,” *Journal of microscopy*, vol. 225, n°. 2, p. 118–125, 2007.

[189] ——, “Quantification of the layer dispersion degree in polymer layered silicate nanocomposites by transmission electron microscopy,” *Polymer*, vol. 49, n°. 7, p. 1841–1852, 2008.

[190] ——, “Quantitative study of the dispersion degree in carbon nanofiber/polymer and carbon nanotube/polymer nanocomposites,” *Materials letters*, vol. 62, n°. 20, p. 3493–3496, 2008.

[191] A. H. Navarchian et K. Majdzadeh-Ardakani, “Processing of transmission electron microscope images for quantification of the layer dispersion degree in polymer-clay nanocomposites,” *Journal of applied polymer science*, vol. 114, n°. 1, p. 531–542, 2009.

[192] S. Pegel *et al.*, “Spatial statistics of carbon nanotube polymer composites,” *Polymer*, vol. 50, n°. 9, p. 2123–2132, 2009.

[193] A. Tscheschel, J. Lacayo et D. Stoyan, “Statistical characterization of tem images of silica-filled rubber,” *Journal of microscopy*, vol. 217, n°. 1, p. 75–82, 2005.

[194] L. de Moura França *et al.*, “Evaluation and assessment of homogeneity in images. part 1 : Unique homogeneity percentage for binary images,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 171, p. 26–39, 2017. [En ligne]. Disponible : http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169743917303611

[195] H. D. Cheng *et al.*, “Fuzzy homogeneity approach to multilevel thresholding,” *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 7, n°. 7, p. 1084–1086, 1998. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276326

[196] R. M. Haralick, K. Shanmugam et I. Dinstein, “Textural features for image classification,” *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, vol. SMC-3, n°. 6, p. 610–621, 1973.

[197] S. Eskenazi, P. Gomez-Krämer et J.-M. Ogier, “A comprehensive survey of mostly textual document segmentation algorithms since 2008,” *Pattern Recognition*, vol. 64, p. 1–14, 2017. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000392682400001

[198] M. Sezgin et B. Sankur, “Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation,” *Journal of Electronic imaging*, vol. 13, n°. 1, p. 146–166, 2004. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000220220900017

[199] D. L. Burris *et al.*, “Polymeric nanocomposites for tribological applications,” *Macromolecular materials and engineering*, vol. 292, n°. 4, p. 387–402, 2007. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000245859300001

[200] M. S. Sadaghiani et K. Witt, "Variability of the grain size distribution of a soil related to suffusion," dans *Proceedings of the 3rd International Symposium on Geotechnical Risk and Safety (ISGSR), Munich, Germany. Edited by N. Vogt, B. Schuppener, D. Straub, and G. Bräu*, 2011, p. 239–248.

[201] H. Li et J. Reynolds, "On definition and quantification of heterogeneity," *Oikos*, vol. 73, n°. 2, p. 280–284, 1995. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:A1995RH16200020

[202] J. Hagman, *Structure Dynamics and Heterogeneity in Soft Materials Determined by FRAP*. Chalmers University of Technology, 2012.

[203] F. Xing et L. Yang, "Robust nucleus/cell detection and segmentation in digital pathology and microscopy images : a comprehensive review," *IEEE reviews in biomedical engineering*, vol. 9, p. 234–263, 2016. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742143

[204] D. L. Pham, C. Xu et J. L. Prince, "Current methods in medical image segmentation," *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 2, n°. 1, p. 315–37, 2000. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701515

[205] H. Irshad *et al.*, "Methods for nuclei detection, segmentation, and classification in digital histopathology : A review—current status and future potential," *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, vol. 7, p. 97–114, 2014. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24802905

[206] M. Veta *et al.*, "Breast cancer histopathology image analysis : A review," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 61, n°. 5, p. 1400–1411, 2014. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759275

[207] C. Park *et al.*, "Segmentation, inference and classification of partially overlapping nanoparticles," *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, vol. 35, n°. 3, p. 1–1, 2012. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848127

[208] M. J. Kumar, D. G. R. Kumar et R. V. K. Reddy, "Review on image segmentation techniques," *International Journal of Scientific Research Engineering & Technology (IJSRET), ISSN*, p. 2278–0882, 2014.

[209] V. W. Berger et Y. Zhou, "Kolmogorov–smirnov test : Overview," *Wiley statsref : Statistics reference online*, 2014.

[210] R. C. Team, "R : A language and environment for statistical computing. r foundation for statistical computing," *(No Title)*, 2013.

[211] E. Rossomacha, C. D. Hoemann et M. S. Shive, "Simple methods for staining chitosan in biotechnological applications," *Journal of Histotechnology*, vol. 27, n°. 1, p. 31–36,

2004. [En ligne]. Disponible : <GotoISI>://WOS:000220628500004

[212] E. C. Lavelle et R. W. Ward, "Mucosal vaccines—fortifying the frontiers," *Nature Reviews Immunology*, vol. 22, n°. 4, p. 236–250, 2022.

[213] G. Deprés-Tremblay *et al.*, "Chitosan inhibits platelet-mediated clot retraction, increases platelet-derived growth factor release, and increases residence time and bioactivity of platelet-rich plasma in vivo," *Biomedical Materials*, vol. 13, n°. 1, p. 015005, 2017.

[214] G. Dwivedi *et al.*, "Injectable freeze-dried chitosan-platelet-rich-plasma implants improve marrow-stimulated cartilage repair in a chronic-defect rabbit model," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 13, n°. 4, p. 599–611, 2019.

[215] Y. K. Sung, D. R. Lee et D. J. Chung, "Advances in the development of hemostatic biomaterials for medical application," *Biomaterials Research*, vol. 25, p. 1–10, 2021.

[216] M. Zamora *et al.*, "Thrombin cleaves prolactin into a potent 5.6-kda vasoinhibin : implication for tissue repair," *Endocrinology*, vol. 162, n°. 12, p. bqab177, 2021.

[217] M. Lavertu *et al.*, "A validated 1h nmr method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 32, n°. 6, p. 1149–1158, 2003.

[218] S. Nguyen, F. M. Winnik et M. D. Buschmann, "Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography," *Carbohydrate Polymers*, vol. 75, n°. 3, p. 528–533, 2009.

[219] Y. Zheng, A. F. Mak et B. Lue, "Objective assessment of limb tissue elasticity : development of a manual indentation procedure," *Journal of rehabilitation research and development*, vol. 36, n°. 2, p. 71–85, 1999.

[220] A. E. Forte *et al.*, "A composite hydrogel for brain tissue phantoms," *Materials & Design*, vol. 112, p. 227–238, 2016.

[221] J. Van Dommelen *et al.*, "Mechanical properties of brain tissue by indentation : interregional variation," *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 3, n°. 2, p. 158–166, 2010.

[222] M. Memon *et al.*, "Fluid extravasation in shoulder arthroscopic surgery : A systematic review," *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, vol. 6, n°. 5, p. 2325967118771616, 2018. [En ligne]. Disponible : https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/2325967118771616

[223] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães et S. J. Ram, "Image processing with imagej," *Biophotonics international*, vol. 11, n°. 7, p. 36–42, 2004.

[224] W. Liu *et al.*, “A chitosan-arginine conjugate as a novel anticoagulation biomaterial,” *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, vol. 15, n°. 11, p. 1199–1203, 2004.

[225] ——, “Anticoagulation activity of crosslinked n-sulfofurfuryl chitosan membranes,” *Journal of applied polymer science*, vol. 94, n°. 1, p. 53–56, 2004.

[226] E. Aleksakhina *et al.*, “Spectral and structural properties of clotting factor proteins under mechanical stress,” dans *Journal of Physics : Conference Series*, vol. 2094. IOP Publishing, 2021, Conference Proceedings, p. 022044.

[227] S. J. Cone *et al.*, “Inherent fibrin fiber tension propels mechanisms of network clearance during fibrinolysis,” *Acta biomaterialia*, vol. 107, p. 164–177, 2020.

[228] Y. Li *et al.*, “Fibrous hydrogels under biaxial confinement,” *Nature Communications*, vol. 13, n°. 1, p. 3264, 2022.

[229] R. P. Watt, H. Khatri et A. R. G. Dibble, “Injectability as a function of viscosity and dosing materials for subcutaneous administration,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 554, p. 376–386, 2019. [En ligne]. Disponible : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517318308305

[230] R. Lechner *et al.*, “In-vitro study of species-specific coagulation differences in animals and humans using rotational thromboelastometry (rotem),” *BMJ Military Health*, vol. 165, n°. 5, p. 356–359, 2019.

[231] W. H. Seegers et H. Smith, “Factors which influence the activity of purified thrombin,” *American Journal of Physiology-Legacy Content*, vol. 137, n°. 2, p. 348–354, 1942.

[232] J. M. Siller-Matula *et al.*, “Interspecies differences in coagulation profile,” *Thrombosis and haemostasis*, vol. 100, n°. 09, p. 397–404, 2008.

[233] R. F. Doolittle, J. L. Oncley et D. M. Surgenor, “Species differences in the interaction of thrombin and fibrinogen,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 237, n°. 10, p. 3123–3127, 1962.

[234] A. Bedi *et al.*, “Rotator cuff tears,” *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 10, n°. 1, p. 8, 2024.

[235] V. Citro *et al.*, “Tendon tissue engineering : An overview of biologics to promote tendon healing and repair,” *Journal of tissue engineering*, vol. 14, p. 20417314231196275, 2023.

[236] A. P. Yubran *et al.*, “Rotator cuff tear patterns : Mri appearance and its surgical relevance,” *Insights into Imaging*, vol. 15, n°. 1, p. 61, 2024.

[237] R. Crusher, “Rotator cuff injuries,” *Accident and Emergency Nursing*, vol. 8, n°. 3, p. 129–133, 2000.

[238] J. B. Carr et S. A. Rodeo, "Biology of injury and repair of soft tissues of the shoulder," dans *Shoulder Arthroscopy : Principles and Practice*. Springer, 2023, p. 33–53.

[239] L. M. Galatz *et al.*, "The outcome and repair integrity of completely arthroscopically repaired large and massive rotator cuff tears," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 86, n°. 2, p. 219–24, 2004. [En ligne]. Disponible : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960664

[240] C. D. Laffite *et al.*, "Biology and physiology of tendon healing," *Joint Bone Spine*, p. 105696, 2024.

[241] C. Cavallo *et al.*, "Platelet-rich plasma : the choice of activation method affects the release of bioactive molecules," *BioMed research international*, vol. 2016, n°. 1, p. 6591717, 2016.

[242] I. A. Trantos *et al.*, "The effect of prp augmentation of arthroscopic repairs of shoulder rotator cuff tears on postoperative clinical scores and retear rates : a systematic review and meta-analysis," *Journal of Clinical Medicine*, vol. 12, n°. 2, p. 581, 2023.

[243] Y. Peng *et al.*, "Efficacy of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in arthroscopic rotator cuff repair : A systematic review and meta-analysis," *PM&R*, vol. 15, n°. 12, p. 1643–1653, 2023.

[244] D. S. R. Rajkumar *et al.*, "Chitosan-based biomaterial in wound healing : A review," *Cureus*, vol. 16, n°. 2, 2024.

[245] Z. Ghazi, A. Chevrier et M. Hurtig, "Freeze-dried chitosan-prp injectable surgical implants for meniscus repair : Pilot feasibility studies in ovine models," *Regenerative Medicine and Therapeutics*, vol. 1, n°. 1, p. 16–29, 2017.

[246] G. Deprés-Tremblay, A. Chevrier et M. D. Buschmann, "Freeze-dried chitosan-prp in a rabbit model of rotator cuff repair," *Transactions Orthopaedic Research Society*, 2017.

[247] F. Milano *et al.*, "Injectable lyophilized chitosan-thrombin-platelet-rich plasma (cs-fiia-prp) implant to promote tissue regeneration : In vitro and ex vivo solidification properties," *Polymers*, vol. 15, n°. 13, p. 2919, 2023.

[248] A. Matson *et al.*, "Tendon material properties vary and are interdependent among turkey hindlimb muscles," *Journal of Experimental Biology*, vol. 215, n°. 20, p. 3552–3558, 2012.

[249] H. Uhthoff *et al.*, "Early reactions after reimplantation of the tendon of supraspinatus into bone : a study in rabbits," *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, vol. 82, n°. 7, p. 1072–1076, 2000.

[250] G. Trudel *et al.*, "Improved strength of early versus late supraspinatus tendon repair : a study in the rabbit," *Journal of shoulder and elbow surgery*, vol. 21, n°. 6, p. 828–834,

2012.

[251] N. A. Friel *et al.*, "Rotator cuff healing after continuous subacromial bupivacaine infusion : an in vivo rabbit study," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 22, nº. 4, p. 489–499, 2013.

[252] K. P. Pritzker *et al.*, "Osteoarthritis cartilage histopathology : grading and staging," *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 14, nº. 1, p. 13–29, 2006.

[253] G. Trudel *et al.*, "Supraspinatus tendon repair into a bony trough in the rabbit : mechanical restoration and correlative imaging," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 28, nº. 6, p. 710–715, 2010.

[254] H. Louati *et al.*, "Supraspinatus tendon repair using anchors : a biomechanical evaluation in the rabbit," *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, vol. 13, p. 1–8, 2018.

[255] M. S. Kacem *et al.*, "Heterotopic ossification of the shoulder after arthroscopic rotator cuff repair : A case report," *International Journal of Surgery Case Reports*, vol. 112, p. 108916, 2023.

[256] T. Tokunaga *et al.*, "Enhancement of rotator cuff tendon–bone healing with fibroblast growth factor 2 impregnated in gelatin hydrogel sheets in a rabbit model," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 26, nº. 10, p. 1708–1717, 2017.

[257] G. D. Learn *et al.*, "Woven collagen biotextiles enable mechanically functional rotator cuff tendon regeneration during repair of segmental tendon defects in vivo," *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials*, vol. 107, nº. 6, p. 1864–1876, 2019.

[258] H. K. Uhthoff *et al.*, "Tensile strength of the supraspinatus after reimplantation into a bony trough : an experimental study in rabbits," *Journal of shoulder and elbow surgery*, vol. 11, nº. 5, p. 504–509, 2002.

[259] M. Kobayashi *et al.*, "Expression of growth factors in the early phase of supraspinatus tendon healing in rabbits," *Journal of shoulder and elbow surgery*, vol. 15, nº. 3, p. 371–377, 2006.

[260] W. H. D. Wee *et al.*, "The current role of collagen patch augmentation in rotator cuff pathology : A narrative review," *BioMed*, vol. 4, nº. 3, p. 256–267, 2024.

[261] G. A. Yakaboylu *et al.*, "Stability and electrical properties of mosi2-and ws i2-oxide electroconductive composites," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 100, nº. 10, p. 4461–4475, 2017.

[262] G. A. Yakaboylu et E. M. Sabolsky, "Determination of a homogeneity factor for composite materials by a microstructural image analysis method," *Journal of Microscopy*,

vol. 266, n°. 3, p. 263–272, 2017.

[263] J. Xu et D. Li, "Preparation and photoluminescence of transparent poly (methyl methacrylate)-based nanocomposite films with ultra-high-loading pendant zns quantum dots," *Polymers*, vol. 10, n°. 11, p. 1217, 2018.

[264] A. Aksac *et al.*, "Brecahad : a dataset for breast cancer histopathological annotation and diagnosis," *BMC research notes*, vol. 12, n°. 1, p. 1–3, 2019.

[265] N. C. da Silva *et al.*, "Evaluation and assessment of homogeneity in images. part 2 : Homogeneity assessment on single channel non-binary images. blending end-point detection as example," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 180, p. 15–25, 2018.

[266] G. Tomaiuolo *et al.*, "Blood linear viscoelasticity by small amplitude oscillatory flow," *Rheologica Acta*, vol. 55, n°. 6, p. 485–495, 2016. [En ligne]. Disponible : https://doi.org/10.1007/s00397-015-0894-3

[267] S. Kar *et al.*, "Formation of blood droplets : Influence of the plasma proteins," *ACS omega*, vol. 3, n°. 9, p. 10 967–10 973, 2018.

ANNEXE A SCHÉMA DE LA CASCADE DE COAGULATION

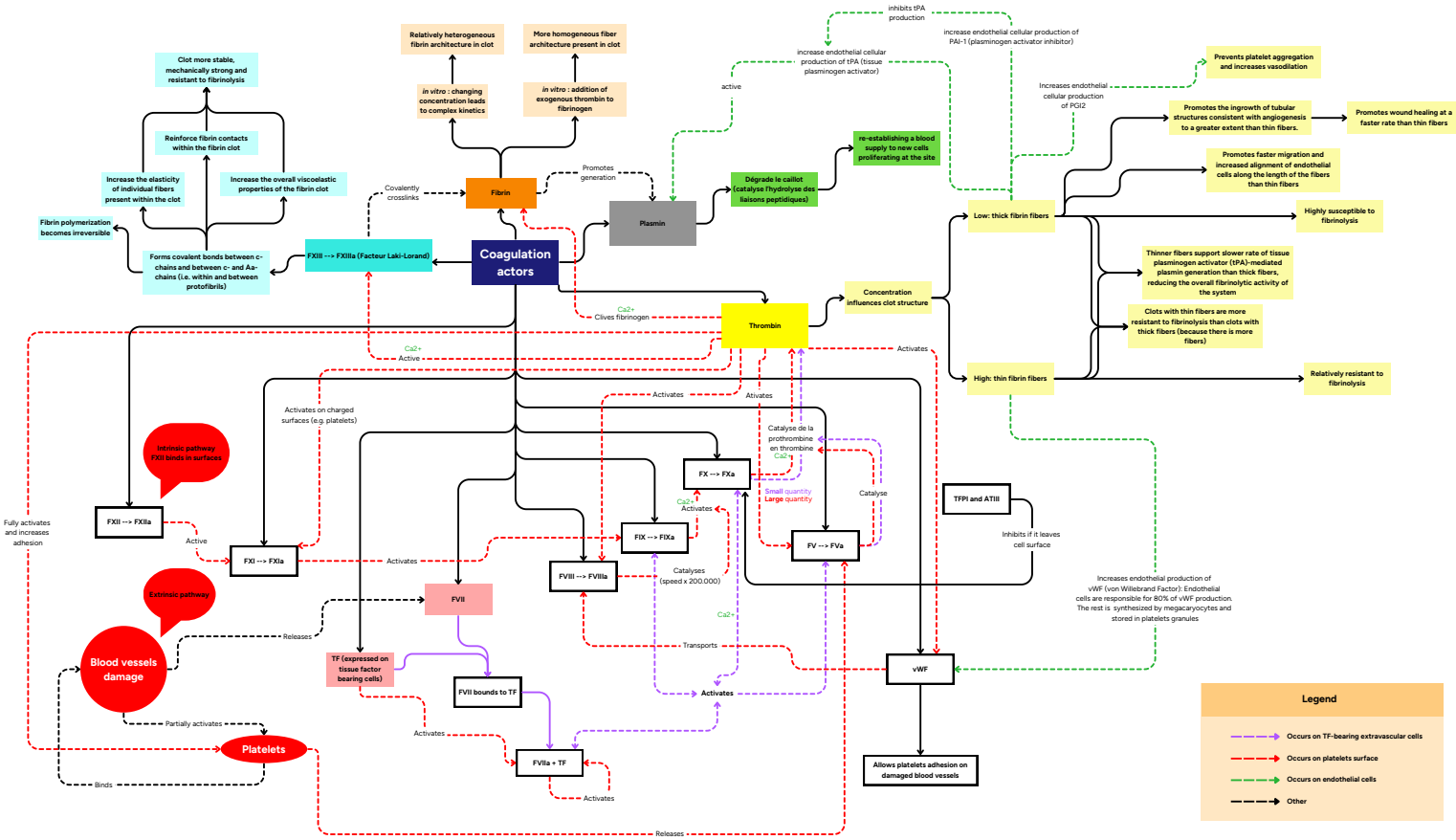


FIGURE A.1 Acteurs de la cascade de coagulation et leurs interactions, basé sur les articles de Heemskerk *et al.* [99], Wolberg *et al.* [103] et Palta *et al.* [98].

ANNEXE B ARTICLE 1, SUPPLEMENTARY INFORMATION 1 : "DETAILS ON THE CS-PRP HYBRID CLOT PREPARATION"

The CS-PRP clots were prepared as described in [2]. Briefly : the CS used were purchased from Primex and processed in-house by heterogenous alkaline deacetylation and nitrous acid depolymerization to obtain a degree of deacetylation between 80% and 85% and a number average molar mass between 40 kDa and 150 kDa, respectively. CS were characterized for their degree of deacetylation and molar mass by 1H NMR [217] and size-exclusion chromatography – multiangle light scattering respectively [218]. CS was dissolved overnight in HCl (at a concentration that would allow protonation of 60% of the amino groups). The next day, stock solutions of 15% (w/v) trehalose and 270 mM calcium chloride were added to the CS solution in order to obtain a final concentration of 1% (w/v) CS, 1% (w/v) trehalose (as lyoprotectant) and 42.2 mM calcium chloride (as a solidifying agent). The final solution was then dispensed in individual glass vials (3 mL in 10 mL glass vials) for freeze-drying, leading to the obtention of porous freeze-dried cakes. The freeze-drying cycle consisted of : 1) Freezing phase, samples are kept 15 min at 20°C, then 30 min at 5°C, then 30 min at -5°C, then ramped freeze (-1°C/min) to -40°C, then isothermal for 2h. 2) Primary drying phase, samples are ramped heated to 8°C (0.5°C/min) at 76 mTorr, then isothermal for 650 min. 3) Secondary drying phase, samples are ramp-heated to 40°C (0.15°C/min) at 76 mTorr then isothermal for 6h. The total freeze-drying time was of 29.5h. Leukocyte-rich PRP was isolated through a double centrifugation method from citrated sheep blood (first spin 800 g for 20 minutes, second spin 600 g for 10 minutes). The cakes were solubilized in 3 mL PRP (10-30 s mixing) and the resulting CS-PRP solutions were placed in glass test tubes at 37°C and allowed to solidify for 1h. The CS-PRP hybrid clots were fixed in 10% NBF and then dehydrated and cleared before paraffin embedding and sectioning of 5 μm thick slices. Sections were dewaxed and stained with Cibacron Brilliant Red and Iron-Hematoxylin as described in [211]. The slides were then scanned at 40x optical magnification using a digital slide scanner (Hamamatsu Nanozoomer RS).

ANNEXE C ARTICLE 1, SUPPLEMENTARY INFORMATION 2 : "MASQH'S ROBUSTNESS : AN ANALYSIS"

Methodology

The robustness of the algorithm regarding parameters k, n and x is assessed by comparing the index obtained for several values of each parameter of the algorithm. k is the number of square sizes used in the index computation, n is the number of squares used per square size and x is the size of the dataset of pixels chosen per square to perform a Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Two types of robustness are examined here : 1) The index's stability regarding a change in the value of a parameter and 2) the index's ability to discriminate two images as the value of a parameter changes. As the algorithm is stochastic, results from 50 computations of the homogeneity index, performed for each k, n and x triplet tested, are here presented.

To assess the robustness, a variety of images were used, from different fields that could benefit from the use of MASQH :

— 9 images of composites from Yakaboylu *et al.* [261, 262],

— 11 images of nanocaomposites fom Rossi *et al.*, Jouault *et al.* and Xu *et al.* [175,178,263],

— 10 images of breast cancer histopathology (Eosin and Hematoxylin stain) from the BreCaHAD dataset [264],

— 15 images of chitosan-platelet rich plasma hybrid clot (Cibacron red and Hematoxylin stain) obtained in the authors' laboratory,

— 15 synthetic images generated with the R software, representing various situations that might occur in several fields

The chosen images are issued from various imaging instrumentation (scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, optical microscopy) and are of diverse sizes and resolution (the smallest analyzed image has a size of 700 x 670 pixels and the largest of 7680 x 4352 pixels).

Results and discussion

The index's variance is $\leq \frac{1}{2kn}$ as demonstrated in the core article. Therefore, for a product kn sufficiently high, the index's variance will be small. This was verified experimentally, as shown in Figure C.1 and Figure C.2. The results from these figures reveal that the algorithm is robust : 1) the homogeneity index is stable and 2) if two images have significatively distinct

indexes, these indexes will remain distinct, for any value of k and n, as long as the kn product is sufficiently high. For example, a kn product of 10000 will allow to discriminate two images with indexes differing by $\sim 3\%$ (the 95% confidence interval's span is of $4\sigma = 4 \times 0.007 = 0.028$). The product was here chosen as $kn = 40000$ to obtain a 95% confidence interval of $\sim 1.5\%$, which is highly sufficient for the author's use of the algorithm (CS-PRP hybrid clot's histology) and allows to keep a small computation time. Specifically, k=100 and n=400 were used, but this choice is arbitrary as only the kn product matters.

The choice of x's value will have an impact on the index's value, for all x's values, as expected. Indeed, the number of pixels chosen per square to perform the KS test (x) has a direct influence on the test's power (as for any statistical test) and thus, on the final index's value. More specifically, if the dataset is too small, the test is not powerful enough and will never reject the null hypothesis H_0 (samples come from the same intensity distribution). On the contrary, when the dataset becomes larger, the test's power increases, and it will more and more often reject H_0. The index's value is therefore a strictly decreasing function of x, as shown on Figure C.3. Hence, strictly speaking, the first type of robustness is not assured. On the other hand, results from Figure C.3 show that the second type of robustness is assured for $x >\sim 5000$. Therefore, although the homogeneity index of an image changes with x, this has no impact on the capacity of the algorithm to discriminate/rank images compared for their homogeneity by using the same value of x (as long as $x >\sim 5000$). Interestingly, computations performed on a diverse and extensive set of images show that increasing the value of x beyond 10000 does not improve the images discrimination (except for uniform images, most images index are only translated when x increases, therefore the index's relative position is kept constant as seen on Figure C.3). A value of $x = 5000$ was chosen by the authors as it allows a sufficient discrimination for their needs (CS-PRP hybrid clot's histology) and allows for a short computation time. It is worth mentioning that theoretically, for extremely large values of x, the index of any image containing pixels with various intensity values would converge to 0, but this was not observed for any of the images tested here with a maximal value of x of 30000.

In summary, the value of the parameter x can be modified by the user to reach the amount of discrimination he needs. Increasing the kn product will decrease the 95% confidence interval's span while increasing x between 5000 and 10000 will modify the index's value. The user should therefore be careful and use a constant x value for every image he wants to compare. The same care should be applied to the choice of the biggest square size l_{max} and of the smallest square size l_{min}. l_{max} is chosen as half the smallest image size to allow a good discrimination of non-homogeneous image while avoiding prioritizing the biggest dimension while l_{min} is field dependent, as mentioned and explained in the core manuscript.

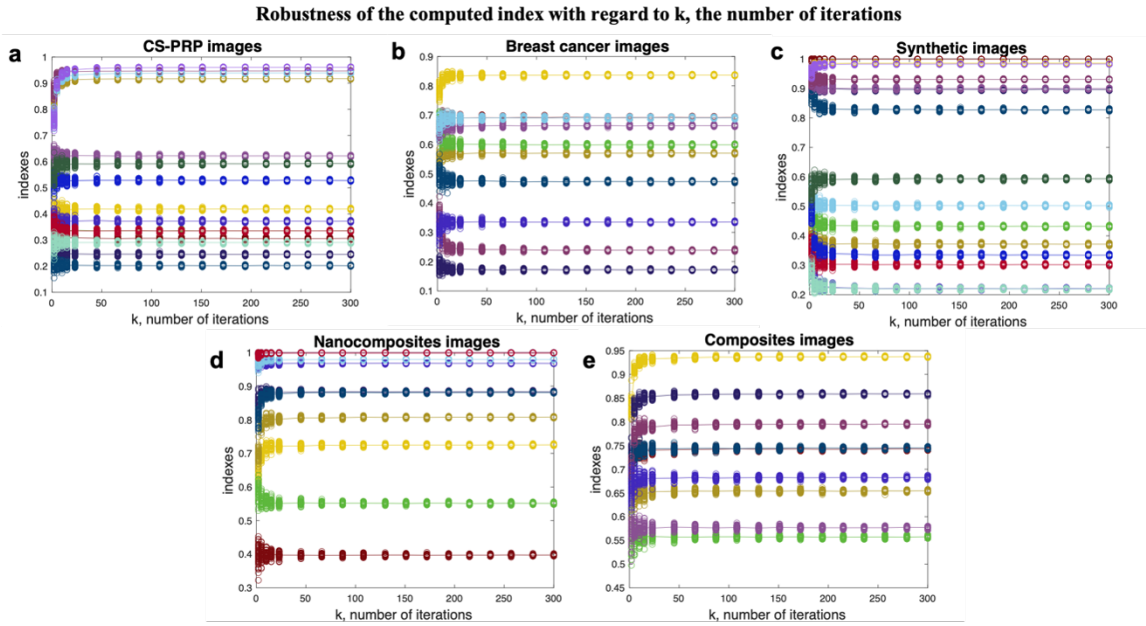


FIGURE C.1 Mean indexes and index distribution (from 50 indexes) in function of the number of iterations used in the algorithm (i.e. the number of square sizes used in the analysis, k). The analysis was performed on 60 different images from 5 different fields : a) CS-PRP hybrid clots images, b) Breast cancer histological images, c) synthetic images, d) nanocomposites images, e) composites images. Each colored line on the graphs corresponds to a specific image. Except for small k values, the index does not vary with k and has a small and decreasing variance. Computations done with $l_{min} = 100$, $n = 400$, $x = 5000$ and several k values between 2 and 300.

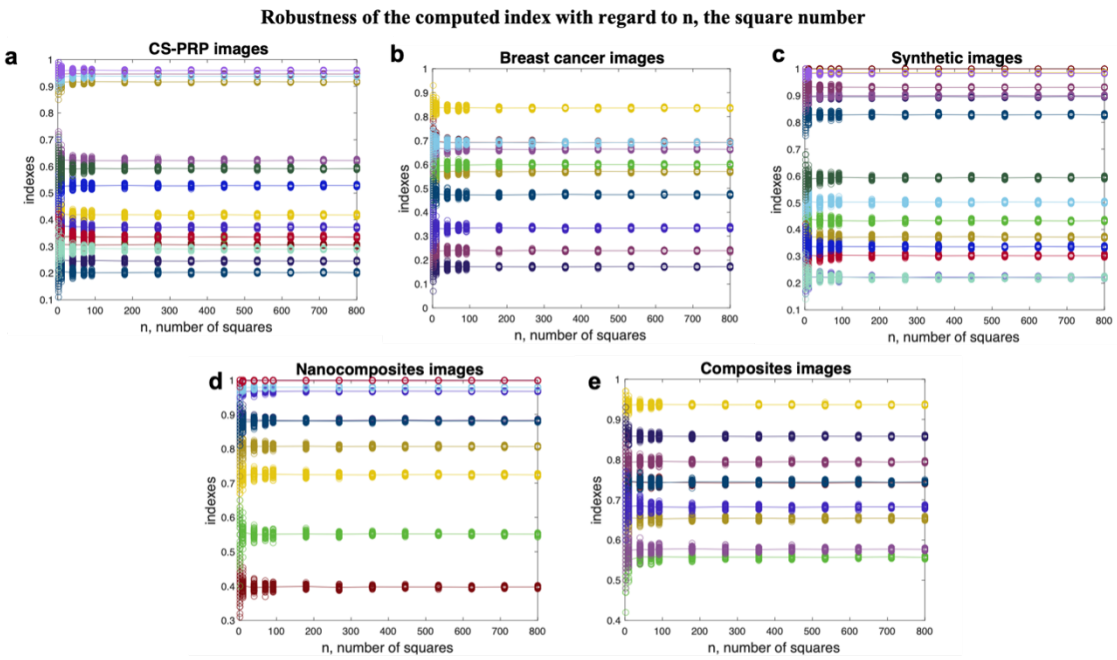


FIGURE C.2 Mean indexes and index distribution (from 50 indexes) in function of n, the number of squares used in the algorithm (i.e. the number of squares randomly selected at each iteration of the algorithm). The analysis was performed on 60 different images from 5 different fields : a) CS-PRP hybrid clots images, b) Breast cancer histological images, c) synthetic images, d) nanocomposites images, e) composites images. Each colored line on the graphs corresponds to a specific image. Except for small n values, the index does not vary with n and has a small and decreasing variance. Computations done with $l_{min} = 100$, $k = 100$, $x = 5000$ and several values n values between 2 and 800.

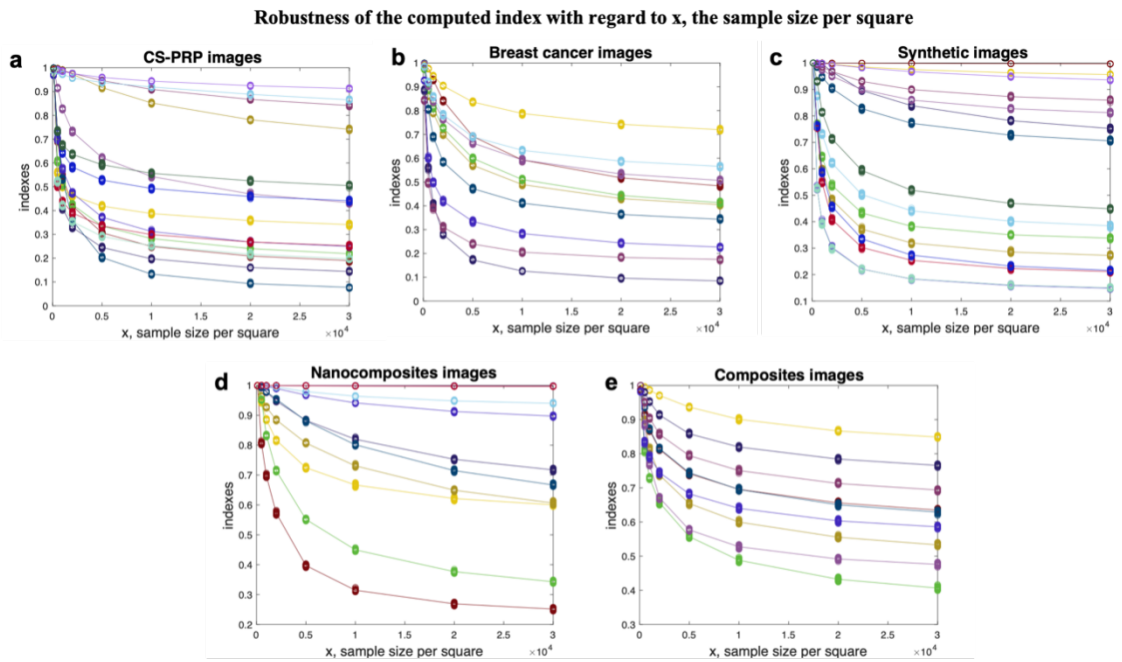


FIGURE C.3 Mean indexes and index distribution (from 50 indexes) in function of x, the number of the sample size (i.e. the number of data randomly chosen in each square selected at each iteration of the algorithm). The analysis was performed on 60 different images from 5 different fields : a) CS-PRP hybrid clots images, b) Breast cancer histological images, c) synthetic images, d) nanocomposites images, e) composites images. Each colored line on the graphs corresponds to a specific image. Too few data lead to a permissive test (not powerful enough), but too many data lead to a strict test (too powerful). To allow both a sensitive analysis and a small computation time, $x = 5000$ was chosen. Computations done with $l_{min} = 100$, $k = 100$, $n = 400$ and several x values between 100 and 30000.

ANNEXE D ARTICLE 1, SUPPLEMENTARY INFORMATION 3 : "COMPARISON OF THE 13 EXISTING ALGORITHMS FOR GLOBAL HOMOGENEITY QUANTIFICATION"

Comparison of the 13 existing algorithms for global homogeneity quantification found in the literature. Please note that the "Quantitative method for measuring filler dispersion" [176] and MASQH are the only two algorithms to provide associated code. Seven of the presented algorithms rely on segmentation. In fields where no robust segmentation method exists, the expected robustness of those algorithms is therefore low.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Two-dimensional quantification of filler dispersion [175]	◦ Start with binarized image. ◦ Multiplication of the initial image with its rotations. ◦ Index between 0 (most homogeneous) and 1 (least homogeneous. ◦ Described field of application : (Nano)composites.	Not mentioned.	Applicability : ◦ Not mentioned but seems applicable to any instrumentation if a binarized image can be obtained. Main limitations : ◦ A circle must be extracted from the binarized image, which leads to a loss of information ($\sim$ 20% area reduction from input square image). ◦ The shape of the nanoparticle has an impact on the index (considered less homogeneous if the nanoparticles are asymmetric). ◦ For a given nanoparticle size and distribution, decreasing the number of particles will always lead to a more homogeneous index. ◦ Segmentation needed.	◦ 16 Synthetic images. ◦ 3 TEM images (size unknown).	Takes only square image and extract circle ($\sim$ 20% reduction with respect to input image). It therefore does not take the images corners into account.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Quantitative method for measuring filler dispersion [176]	◦ Method based on the free-space length L_f. ◦ Starts with a binarized image L_f is the largest square randomly. placed in the image for which the most probable number of contained particles is 0. ◦ Index given in units of length. ◦ Described field of application : Nanocomposites.	Algorithm said to be robust, but robustness not assessed.	Applicability : ◦ Not mentioned but seems applicable to any instrumentation if a binarized. image can be obtained. Main limitations : ◦ The index varies a lot with small changes in the binarization process as assessed during our use of the algorithm (decreasing the algorithm's robustness). ◦ Segmentation needed.	◦ Synthetic images (unknown number and size). ◦ 3 TEM images of unknown resolution.	Squares are randomly placed in the image. They must be fully contained in the image. As for MASQH, the image's borders have a lower probability to be analyzed. So inhomogeneities will be less quickly detected if they are on the image's borders.
Homogeneity quantification of nanoparticles in composite materials [177]	◦ Two methods using machine-learning are proposed, one based on the k-nearest neighbors and the other based on the information entropy. ◦ The object's center needs to be identified. ◦ To analyze real images, they have to be binarized. ◦ Described field of application : Nanocomposites.	Not mentioned.	Applicability : ◦ Not mentioned. Seems applicable to any instrumentation if a binarized image can be obtained. Main limitations : ◦ Particles/objects must be of the same size. ◦ Localizing the object's center is computationally demanding. ◦ Segmentation needed.	230 synthetic images (size unknown).	Not mentioned, seems nonexistent.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Quantitative assessment of the reinforcement distribution homogeneity in carbon nanotubes (CNT)/metal composites [178]	◦ Based on the Lorentz curve using the number of objects or the amount of phase (total area of objects) in sub-images. ◦ homogeneity proportional to area under curve. ◦ Starts with a binarized image. ◦ Uses 20 sub-images. ◦ Described field of application : CNT/metal composites.	Not mentioned. However, it should be noted that modifying the number of sub-images results in an important variation of the index as explained in the article.	Applicability : ◦ Images must be $255\mu m \times 220\mu m$. Main limitations : ◦ This algorithm uses only one size of sub-images to measure free-space and could therefore miss homogeneities present at other scales. ◦ To apply this algorithm to other fields, the size of the sub-images will likely have to be changed. ◦ No information is given on how to find the "right" scale. ◦ Segmentation needed.	3 CNT/metal composites TEM images (size unknown).	Not mentioned, index does not seem dependent on position.
TEM based direct mathematical quantifiers for dispersion in nanocomposites [185]	◦ Analysis of the 2D-TEM micrographs using integral geometry and spatial statistics. ◦ Starts with binarized images ◦ Developed for clay particles nanocomposites. ◦ Described field of application : Clay nanocomposites.	Not mentioned.	Applicability : ◦ The algorithm needs changes to be used for other images than clay nanocomposites. Main limitations : ◦ Segmentation needed. ◦ Limited applicability.	9 TEM images of clay nanocomposites (size unknown).	Not mentioned, seems nonexistent.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Quantitative assessment of CNT dispersion in polymer matrices [187]	◦ The material should first be assessed homogeneous by comparison of fractal dimensions from images from different locations. ◦ Then, if homogeneous, 4 parameters are computed that relate to the dispersion of the nanomaterial (based on radial power spectral density, fractal dimension, and Minkowski functionals). ◦ Provides information on length, thickness, spacing, and regularity of homogeneous images. ◦ Analysis done in the spectral domain. ◦ Described field of application : Nanocomposites.	Not mentioned.	Applicability : ◦ The article uses scanning electron microscope images but mentions that the methodology is applicable to images from other types of microscopes. Main limitation : ◦ It only analyzes further images that have already be analyzed as homogeneous. It therefore does not allow to classify various images with a homogeneity index.	SEM micrographs (size unknown).	Not mentioned, seems nonexistent.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Quantifying the dispersion of mixture microstructures [188], methodology applied to polymer layered silicate nanocomposites in Luo *et al.* 2008 [189], and to carbon nanofiber and nanotube reinforced polymer nanocomposites in Luo *et al.* 2008 [190]	◦ Image pre-processing needed to remove background and identify particles or particles are identified visually. ◦ Two quantities are proposed, which are the probabilities of the free-space around a particle to be in the ranges of $\mu \pm 0.1\mu$ and $\mu \pm 0.2\mu$, respectively, μ being the experimental mean free-space. ◦ Free spaces are measured on 10 x 10 to 20 $\times$ 20 equal distance horizontal and vertical grid lines, respectively (the choice of the number of lines is not explained). ◦ Described field of application : (Nano)composites.	Not mentioned. However, it should be noted that modifying the grid used to measure free-space could result in an important variation of the index. Also, as mentioned in [189], the index's accuracy "strongly depends on the sampling."	Applicability : ◦ Not mentioned, but seems applicable to any instrumentation if a binarized image can be obtained. Main limitations : ◦ This algorithm uses only one size of sub-images to measure free-space and could therefore miss homogeneities present at other scales. ◦ To apply this algorithm to other field, the size of the sub-images will likely have to be changed. ◦ No information is given on how to find the "right" scale. ◦ Segmentation or visual identification of particles needed.	TEM images (unknown number and size).	Not mentioned, seems nonexistent.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Spatial statistics of carbon nanotubes polymer composites [192]	◦ Quantification of the tendency of nanotubes to clusters and of characteristic distances between nanotubes and nanotubes clusters. ◦ Starts with a binarized image. ◦ Statistics are computed by counting the number of intersections between nanotubes and vertical & horizontal lines drawn every 10 pixels. ◦ The accurate nanotubes diameter must be known. ◦ Results are considered to indicate a good dispersion if the expected volume fraction occupied by nanocomposites is similar on a macroscopic and on a microscopic scale. ◦ Described field of application : Carbon nanotubes/ polymer (nano)composites.	Not mentioned. However, it should be noted that modifying the grid used to measure the characteristics could result in an important variation of the index.	Applicability : ◦ It is mentioned that some of the concepts could also be adapted to composites using other nanoparticles. Seems applicable to any instrumentation if a binarized image can be obtained. Main limitations : ◦ This algorithm uses only one size of sub-images and could therefore miss homogeneities present at other scales. ◦ To apply this algorithm to other field, the size of the sub-images will likely have to be changed. ◦ No information is given on how to find the “right” scale. ◦ The method cannot be applied if the size of the objects to be analyzed is not precisely known. ◦ Segmentation needed.	3 TEM images of clay nanocomposites (size unknown).	Not mentioned, seems inexistant.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Statistical characterization of TEM images of silica-filled rubber [193]	◦ Uses the gray-levels of the TEM images, considered as realizations of random-fields. ◦ Analysis of the variability of the micro-distribution of filler within a matrix. ◦ Computes two statistics of the random field : variance and median range. Used together, they allowed to discriminate between the dispersion level of 4 compounds. ◦ Described field of application : Any images containing information in its gray-level distribution, although it was only tested on TEM images in the article.	Algorithm said to be robust, but robustness not assessed.	Applicability : ◦ Seems applicable to gray-level images from any instrumentation, size and field. Main limitations : ◦ This algorithm will not be able to discriminate between two images having exactly the same gray-level but distributed differently. It therefore does not completely characterize the gray-levels distribution. ◦ If the image's background has a high variance, this index will more likely characterize the background than the object's distribution.	TEM images (40 images issued from 4 compounds, 1280x1024 pixels, 12-bits grey-values).	Not mentioned, seems nonexistent.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Unique homogeneity percentage for binary images [182]. This algorithm is adapted for homogeneity assessment on single channel non-binary images [265]	◦ Gives an absolute homogeneity value. ◦ Starts with a binary image [194] or with a single-channel non-binary image [183]. ◦ Based on micropixel analysis theory and the generation of an "homogeneity curve". ◦ Gives a homogeneity percentage. ◦ Divides the whole image into square sub-images ("grid" placed over the image) and compute the standard deviation (std) of each sub-image and the mean std. ◦ The size of the sub-images is increased with each iteration of the algorithm. ◦ Homogeneity percentage computed as the area under the curve. ◦ Described field of application : Any binarized image for [194] and any gray-scale image for [265], theretically.	Not mentioned in the case of binarized images, and mentioned but not assessed for gray-scale images.	Applicability : ◦ Seems applicable to binarized images and gray-level images from any instrumentation, size and field. Main limitations : ◦ The whole image is divided into squares. Therefore, when the squares get small, the computation time can be important if the image is big, as their will be a huge number of squares. ◦ The biggest square used is the whole image, and the smallest a single pixel. Every size in between these two values seems to be tested. This also represents a huge computation time for big images. ◦ No information is given on how to place the biggest squares on a non-square image.	◦ Over 1000 Synthetic images for [194]. ◦ Real images : One RGB image from digital camera and 244 images from confocal laser scanning microscopy for [194]. ◦ 70 Grayscale images with different spatial distribution of their elements, down-sampled to a 100x100 pixels size [265]. ◦ Images of different mixture of powders acquired with a RGB camera for [265] (unknown number). Note that for most images, size was not provided.	Not mentioned. However, it should be noted that when dividing the images into sub-images, the whole corners are always part of a sub-image without ever being divided. On the contrary, the center of the image is likely to sometime belong to a single sub-image and sometime to be divided into four sub-images, depending on the division. This introduces a kind of border effect.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Heterogeneity assessment of histological tissue sections in whole slide images [179]	◦ Measures heterogeneity in whole slide images. ◦ Based on diffusion maps technique. ◦ A database is constructed by extracted features from well-known images (statistical measures and texture parameters). ◦ Global heterogeneity is quantified by computing Rao's quadratic entropy from N connected sub-images (small squares of size 50x50 pixels, equivalent to place a "grid" over the image). The index results from the sum of the pseudo-color difference observed for every possible pair of sub-image. ◦ Local and regional homogeneity can also be compared. ◦ Described field of application : Cancer histopathology.	Not mentioned.	Applicability : ◦ Seems applicable to images from any instrumentation, size and field. Main limitations : ◦ As mentioned in the article, the computational burden is important. ◦ This algorithm uses only one size of sub-images and could therefore miss homogeneities present at other scales. ◦ To apply this algorithm to other field, the size of the sub-images will likely have to be changed. ◦ No information is given on how to find the "right" scale.	4 images of 3000x2000 pixels of H&E-colored histological tissue section.	Not mentioned. However, it should be noted that when dividing the images into sub-images, the whole corners are always part of a sub-image without ever being divided. On the contrary, the center of the image is likely to sometime belong to a single sub-image and sometime to be divided into four sub-images, depending on the division. This introduces a kind of border effect.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
Genetic programming for prediction of fat content in meat images [182]	◦ Quantification of fat homogeneity. ◦ Starts with binarized images. ◦ Based on the division of the images into sub-images with size decreasing at each iteration (at each iteration, each sub-image from the previous iteration is divided into 4 new sub-images). ◦ At each iteration, the fat percentage is computed in each sub-image and the standard deviation of every percentages are computed. A curve of standard deviations obtained at each iteration is drawn. The slope of the curve is an indicator of homogeneity. ◦ Described field of application : Food industry.	Not mentioned.	Applicability : ◦ Seems applicable to binarized images from any instrumentation, size, and field. Main limitations : ◦ The whole image is divided into sub-images. Therefore, when the squares get small, the computation time can be important if the image is big, as their will be a huge number of squares. ◦ No indication on how to choose the smallest analysis scale (smallest sub-image analyzed). ◦ Segmentation needed.	Meat images (unknown number and size).	Not mentioned. However, it should be noted that when dividing the images into sub-images, the whole corners are always part of a sub-image without ever being divided. On the contrary, the center of the image is likely to sometime belong to a single sub-image and sometime to be divided into four sub-images, depending on the division. This introduces a kind of border effect.

Algorithm	Main features	Robustness	Applicability to images from different instruments/fields and main limitations	Images tested (field, number and size)	Dependance on inhomogeneities position.
MASQH	◦ Measure homogeneity on one-channel gray-level images. ◦ Based on a statistical comparison of sub-images of decreasing sizes randomly placed in the image. ◦ Choice of parameters explained and applicable to various domain (only one parameter is field-dependent). ◦ Algorithm is applicable to large-size images with a short computation time. ◦ Described field of application : histology, histopathology, (nano)composites and food industry. Only the later has not been tested.	The algorithm robustness is analyzed and confirmed (index robustness in function of hyperparameter's change in values).	Applicability : ◦ Seems applicable to gray-level images from any instrumentation, size, and field. Main limitations : ◦ Comparison of images index is only possible if the algorithm's parameters are the same and if images size and method of acquisition are the same. ◦ Presence of one field-dependent parameter.	◦ 15 synthetic images. ◦ 15 images of CS-PRP hybrid biomaterials colored with Cibacron red and hematoxylin. ◦ 10 images from cancer histopathology colored with eosin and hematoxylin. ◦ 11 images of nanocomposites. ◦ 9 images of composites. Size ranging from 700x670 pixels to 7680x4352 pixels	Squares are randomly placed in the image. They must be fully contained in the image. Therefore, the image's borders have a lower probability to be analyzed, so inhomogeneities will be less quickly detected if they are on the image's borders.

ANNEXE E ARTICLE 2, SUPPLEMENTARY INFORMATION 1 : "CHOICE OF RHEOLOGICAL PARAMETERS"

Assessment of clotting properties of CS-PRP formulations through rheology measurements The linear viscoelastic region of the samples was observed to be from 0 to 2% strain (data not shown), which is in accordance with previous studies on blood coagulations [226, 266]. A fixed 1% strain was therefore chosen for time sweeps tests. To determine the frequency to use in time sweeps, a frequency sweep was performed (data not shown). The sample appeared as a viscous solid at high frequencies (>40 rad/s) before appearing as a viscoelastic liquid at lower frequencies. This can be indicative of the sample's behavior at high frequencies : it was previously reported for non-coagulated blood and other macromolecular solutions that G' (storage modulus) > G" (loss modulus) for high frequencies (>10 rad/s) [226, 266, 267]. A hypothesis given for this behavior is that for low frequencies, the system predominantly loses energy, since the translational movement of molecules through the solvent predominates over contortion. For higher frequencies, the movements of chain segments become more important and G' increases. This increase of G' can be attributed to the mechanism for storing elastic energy, which is probably the contortion of plasma proteins and the deformation of individual RBCs. This hypothesis is given by Alves *et al.* [226]. For safety measures, a fixed frequency of 5 rad/s was therefore used in time sweeps tests. In light of those results, rheological properties were measured during a time sweep over the course of either 1 hour or 15 minutes, at a fixed 1% strain and a fixed 5 rad/s frequency. All measurements were performed at 37°C.

ANNEXE F ARTICLE 2, SUPPLEMENTARY INFORMATION 2 : "VIDEO OF BIOMATERIAL'S COAGULATION"

The following supporting information can be downloaded at : `https://zenodo.org/record/7992063`. Video S1 shows the coagulation of the biomaterial for the analyzed thrombin concentrations.

ANNEXE G ARTICLE 3, SUPPLEMENTARY INFORMATION 1 : "MECHANICAL TESTS ON SUPRA-SPINATUS TENDONS."

SSP muscle-tendon-humerus complexes were tawed at 4°C overnight. Once thawed, the supraspinatus muscle was meticulously removed to isolate the intramuscular tendon. Each humerus was then securely potted within a stainless steel cylinder (⌀ 17 mm, 75 mm long), filled with fast-curing orthodontic acrylic resin (Ortho-Jet, Lang Dental Manufacturing Co Inc., IL, USA). This cylinder was subsequently mounted to a custom fixture, which was attached to the base of a Mach-1™ mechanical tester MA056-v500css (Biomomentum Inc., QC, Canada). Each specimen was positioned so that the long axis of the tendon was aligned vertically with the test actuator, equipped with a 250N uniaxial load cell.

Four linear markers were drawn along the length of the tendon, allowing to digitally track regional tissue displacement. These markers delimited three distinct regions, as previously done by Friel *et al.* [251] : from the humerus to the tendon–bone insertion (region 1), from the tendon–bone insertion to the tip of the tendon fibrocartilage (region 2), and from the tip of the fibrocartilage to the myotendinous junction (region 3), located 10 mm further proximal where the grip was placed.

To prevent tissue slippage during tensile testing, 220 grit abrasive paper was placed in a C-shaped grip (Product n° MA-098, Biomomentum Inc., QC, Canada) on both sides of the tendon. The linear markers were used to make sure no slippage occurred during testing. Validation tests were also performed on healthy tendons (G2) then on damaged tendon (G3) before testing G4-G6. Each specimen was preloaded at 5 N (at a speed of 0.1 mm/s), a force below the threshold required for the tendon to enter its linear deformation range. The thickness of the tendon was measured using a precision caliper with 0.1-mm resolution at three locations : as close as possible to the bone, as close as possible to the grip and in the middle. The width of the tendon was mesured at the same locations using photo analysis. The tendon cross-sectional area was calculated as the product of the tendon averaged width and averaged thickness. A picture of the tendon, aligned along its axis with a ruler, was taken to measure tissue length. Thirty preconditioning cycles of 0.125% of the tendon's length were then performed at 0.25 Hz. Subsequently, the tendon was preloaded to 30N (at a speed of 0.1 mm/s), a force sufficient to place the tendon within its linear deformation range, as previously determined on healthy tendon samples. This was followed by another set of thirty preconditioning cycles of 0.125% of the tendon's length at 0.25 Hz. The tendon was then elongated by 3% of its length at a speed of 0.1 mm/s and allowed to relax for 600 seconds

to measure the stress-relaxation function. Three sinusoidal deformations with an amplitude of 0.5% of the tendon's length were applied at frequencies of 0.1 Hz, 0.2 Hz, and 1.0 Hz, respectively. This process was repeated, with the tendon being elongated again by 3% of its length and allowed to relax for another 600 seconds, followed by three more sinusoidal deformations at the same frequencies. To maintain tissue hydration, phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature was sprayed on the tendon every 5 minutes. Tensile testing data was recorded synchronously with optical tissue deformation using a 1.3 MPX digital camera with an acquisition rate of 5 fps. A dedicated motion-analysis software (GOM Correlate 2019) was employed to compute strain for each of the three regions. The motion-analysis software was used to define segment lengths (L1, L2, and L3 for regions 1, 2, and 3, respectively) as the linear distance between the respective markers defining each region. Dynamic strain was calculated as the strain sinusoid's amplitude relative to the total length at the preloaded state. Static strain was calculated as the percentage change in total length during the 3% elongations relative to the preloaded state. Dynamic modulus was computed as dynamic stress amplitude divided by dynamic strain amplitude, while Young's modulus (static) was determined as the steepest slope spanning 30% of the stress-strain curve's datapoints during the 3% elongations, as previously done by Friel *et al.* [251]. The similarity in modulus obtained during both elongations (less than 15% difference for all samples) confirmed that the tendon was within its linear deformation range for both dynamic and static tests. Finally, as previously done by Friel *et al.* [251], the deformation ratio for each region was determined by measuring the change in segment length relative to the preloaded condition and normalizing it against the total deformation of the tendon–bone complex. As an example, the deformation ratio for region 1 was calculated as : $L_1 - L_{01}/[(L_1 - L_{01}) + (L_2 - L_{02}) + (L_3 - L_{03})]$.

ANNEXE H ARTICLE 3, SUPPLEMENTARY INFORMATION 2 : "HISTOLOGICAL SCORES OF TENDONS AND INSERTION SITES"

Table S1 : Distribution and frequencies of tendon scores at Day 14 (2 weeks)

Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Cellularity	n	%	n	%	n	%			
Minimal (0)	0	0	0	0	16	100	p^1	p^1	p^1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	6	50	8	66.7	0	0	0.3593	0.0003	0.0003
Marked (3)	6	50	4	33.3	0	0			
Tenocytes	n	%	n	%	n	%			
Marked (0)	0	0	0	0	16	100	p^1	p^1	p^1
Moderate (1)	0	0	0	0	0	0			
Mild (2)	6	50	8	66.7	0	0	0.3593	0.0003	0.0003
Minimal (3)	6	50	4	33.3	0	0			
Inflammatory cells	n	%	n	%	n	%			
None (0)	4	33.3	12	100	16	100	p^1	p^1	p^1
Mild (1)	5	41.7	0	0	0	0			
Moderate (2)	3	25	0	0	0	0	0.0011	0.0003	1.0000
Marked (3)	0	0	0	0	0	0			
Vacularity	n	%	n	%	n	%			
Minimal (0)	0	0	0	0	16	100	p^1	p^1	p^1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	6	50	8	66.7	0	0	0.3593	0.0003	0.0003
Marked (3)	6	50	4	33.3	0	0			
Tissue organization	n	%	n	%	n	%			
Native tendon (0)	0	0	0	0	16	100			
Repair tissue mostly tendon-like (1)	0	0	0	0	0	0			
Repair tissue a mixture of tendon-like tissue and highly cellular and vascular tissue (2)	6	50	8	66.7	0	0	p^1	p^1	p^1
Repair tissue highly cellular and vascular tissue (3)	6	50	4	33.3	0	0	0.3593	0.0003	0.0003
Heterotopic bone formation within tendon	n	%	n	%	n	%			
None (0)	12	100	11	91.7	16	100	p^1	p^1	p^1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	0	0	0	0	0	0	0.5000	1.0000	0.4286
Marked (3)	0	0	1	8.3	0	0			
Chondrogenesis within tendon	n	%	n	%	n	%			

	Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Tendon	None (0)	11	91.7	6	50	16	100	p[1]	p[1]	p[1]
	Mild (1)	0	0	4	33.3	0	0			
	Moderate (2)	1	8.3	2	16.7	0	0	0.0335	0.4286	0.0030
	Marked (3)	0	0	0	0	0	0			
	Fatty infiltration within tendon	n	%	n	%	n	%			
	None (0)	2	16.7	1	8.3	16	100	p[1]	p[1]	p[1]
	Mild (1)	8	66.7	10	83.3	0	0			
	Moderate (2)	2	16.7	1	8.3	0	0	0.6818	0.0003	0.0003
	Marked (3)	0	0	0	0	0	0			
	Total score (Sum)	n	%	n	%	n	%			
	1	0	0	0	0	16	100			
	2	0	0	0	0	0	0			
	2	0	0	0	0	0	0			
	13	0	0	0	0	0	0			
	4	0	0	0	0	0	0			
	5	0	0	0	0	0	0			
	6	0	0	0	0	0	0			
	7	0	0	0	0	0	0			
	8	0	0	0	0	0	0			
	9	3	25	3	25	0	0			
	10	2	16.7	4	33.3	0	0	p[1]	p[1]	p[1]
	11	1	8.3	0	0	0	0			
	12	1	8.3	0	0	0	0	0.3442	0.0003	0.0003
	13	0	0	2	16.7	0	0			
	14	2	16.7	3	25	0	0			
	15	2	16.7	0	0	0	0			
	16	0	0	0	0	0	0			
	17	1	8.3	0	0	0	0			
	18	0	0	0	0	0	0			
	19	0	0	0	0	0	0			
	20	0	0	0	0	0	0			
	21	0	0	0	0	0	0			
	22	0	0	0	0	0	0			
	23	0	0	0	0	0	0			
	24	0	0	0	0	0	0			

[1] p-value from Exact Wilcoxon

Table S2 : Distribution and frequencies of tendon scores at Day 28 (4 weeks)

Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Cellularity	n	%	n	%	n	%			
Minimal (0)	0	0	0	0	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	3	25	1	8.3	0	0	0.3636	0.0003	0.0003
Marked (3)	9	75	11	91.7	0	0			
Tenocytes	n	%	n	%	n	%			
Marked (0)	0	0	0	0	16	100	p1	p1	p1
Moderate (1)	0	0	0	0	0	0			
Mild (2)	3	25	1	8.3	0	0	0.3636	0.0003	0.0003
Minimal (3)	9	75	11	91.7	0	0			
Inflammatory cells	n	%	n	%	n	%			
None (0)	6	50	12	0	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	5	41.7	0	0	0	0			
Moderate (2)	1	8.3	0	0	0	0	0.0303	0.0150	1.0000
Marked (3)	0	0	0	0	0	0			
Vacularity	n	%	n	%	n	%			
Minimal (0)	0	0	0	0	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	3	25	1	8.3	0	0	0.3636	0.0003	0.0003
Marked (3)	9	75	11	91.7	0	0			
Tissue organization	n	%	n	%	n	%			
Native tendon (0)	0	0	0	0	16	100			
Repair tissue mostly tendon-like (1)	0	0	0	0	0	0	p1	p1	p1
Repair tissue a mixture of tendon-like tissue and highly cellular and vascular tissue (2)	3	25	1	8.3	0	0			
Repair tissue highly cellular and vascular tissue (3)	9	75	11	91.7	0	0	0.3636	0.0003	0.0003
Heterotopic bone formation within tendon	n	%	n	%	n	%			
None (0)	11	91.7	8	66.7	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	1	8.3	0	0	0	0			
Moderate (2)	0	0	2	16.7	0	0	0.0909	0.4286	0.0549
Marked (3)	0	0	2	16.7	0	0			
Chondrogenesis within tendon	n	%	n	%	n	%			
None (0)	12	100	12	100	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	0	0	0	0	0	0	1.0000	1.0000	1.0000
Marked (3)	0	0	0	0	0	0			

	Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Tendon	Fatty infiltration within tendon	n	%	n	%	n	%			
	None (0)	6	100	3	25	16	100	p1	p1	p1
	Mild (1)	6	100	9	75	0	0			
	Moderate (2)	0	0	0	0	0	0	0.2348	0.0150	0.0030
	Marked (3)	0	0	0	0	0	0			
	Total score (Sum)	n	%	n	%	n	%			
	1	0	0	0	0	16	100			
	2	0	0	0	0	0	0			
	2	0	0	0	0	0	0			
	13	0	0	0	0	0	0			
	4	0	0	0	0	0	0			
	5	0	0	0	0	0	0			
	6	0	0	0	0	0	0			
	7	0	0	0	0	0	0			
	8	1	8.3	0	0	0	0			
	9	1	8.3	1	8.3	0	0			
	10	1	8.3	0	0	0	0	p1	p1	p1
	11	0	0	0	0	0	0			
	12	2	16.7	3	25	0	0			
	13	3	25	4	33.3	0	0	0.2944	0.0003	0.0003
	14	4	33.3	0	0	0	0			
	15	0	0	2	16.7	0	0			
	16	0	0	2	16.7	0	0			
	17	0	0	0	0	0	0			
	18	0	0	0	0	0	0			
	19	0	0	0	0	0	0			
	20	0	0	0	0	0	0			
	21	0	0	0	0	0	0			
	22	0	0	0	0	0	0			
	23	0	0	0	0	0	0			
	24	0	0	0	0	0	0			

[1] p-value from Exact Wilcoxon

Table S3 : Distribution and frequencies of tendon scores at Day 84 (3 months)

Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Cellularity	n	%	n	%	n	%			
Minimal (0)	0	0	0	0	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	1	8.3	0	0			
Moderate (2)	4	33.3	2	16.7	0	0	0.6299	0.0003	0.0003
Marked (3)	8	66.7	9	75	0	0			
Tenocytes	n	%	n	%	n	%			
Marked (0)	0	0	0	0	16	100	p1	p1	p1
Moderate (1)	0	0	1	8.3	0	0			
Mild (2)	3	25	2	16.7	0	0	0.5000	0.0003	0.0003
Minimal (3)	9	75	9	75	0	0			
Inflammatory cells	n	%	n	%	n	%			
None (0)	12	100	12	100	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	0	0	0	0	0	0	1.0000	1.0000	1.0000
Marked (3)	0	0	0	0	0	0			
Vacularity	n	%	n	%	n	%			
Minimal (0)	0	0	0	0	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	4	33.3	3	25	0	0	0.5000	0.0003	0.0003
Marked (3)	8	66.7	9	75	0	0			
Tissue organization	n	%	n	%	n	%			
Native tendon (0)	0	0	0	0	16	100			
Repair tissue mostly tendon-like (1)	0	0	0	0	0	0	p1	p1	p1
Repair tissue a mixture of tendon-like tissue and highly cellular and vascular tissue (2)	3	25	3	25	0	0			
Repair tissue highly cellular and vascular tissue (3)	9	75	9	75	0	0	0.7165	0.0003	0.0003
Heterotopic bone formation within tendon	n	%	n	%	n	%			
None (0)	12	100	6	50	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	0	0	2	16.7	0	0	0.0909	1.0000	0.0549
Marked (3)	0	0	4	33.3	0	0			
Chondrogenesis within tendon	n	%	n	%	n	%			
None (0)	12	100	12	100	16	100	p1	p1	p1
Mild (1)	0	0	0	0	0	0			
Moderate (2)	0	0	0	0	0	0	1.0000	1.0000	1.0000
Marked (3)	0	0	0	0	0	0			

	Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Tendon	Fatty infiltration within tendon	n	%	n	%	n	%			
	None (0)	1	8.3	3	25	16	100	p1	p1	p1
	Mild (1)	7	58.3	7	58.3	0	0			
	Moderate (2)	4	33.3	2	16.7	0	0	0.1569	0.0003	0.0003
	Marked (3)	0	0	0	0	0	0			
	Total score (Sum)	n	%	n	%	n	%			
	1	0	0	0	0	16	100			
	2	0	0	0	0	0	0			
	2	0	0	0	0	0	0			
	13	0	0	0	0	0	0			
	4	0	0	0	0	0	0			
	5	0	0	0	0	0	0			
	6	0	0	1	8.3	0	0			
	7	0	0	0	0	0	0			
	8	1	8.3	0	0	0	0			
	9	1	8.3	1	8.3	0	0			
	10	1	8.3	0	0	0	0	p1	p1	p1
	11	1	8.3	0	0	0	0			
	12	0	0	2	16.7	0	0			
	13	5	41.7	3	25	0	0	0.2294	0.0003	0.0003
	14	3	25	1	8.3	0	0			
	15	0	0	1	8.3	0	0			
	16	0	0	1	8.3	0	0			
	17	0	0	2	16.7	0	0			
	18	0	0	0	0	0	0			
	19	0	0	0	0	0	0			
	20	0	0	0	0	0	0			
	21	0	0	0	0	0	0			
	22	0	0	0	0	0	0			
	23	0	0	0	0	0	0			
	24	0	0	0	0	0	0			

[1] p-value from Exact Wilcoxon

Table S4 : Distribution and frequencies of tendon insertion scores at Day 14 (2 weeks)

	Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Tendon insertion	Attachment	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Complete (0)	8	66.7	8	66.7	16	100			
	Partial (1)	0	0	0	0	0	0	0.5000	0.0150	0.0549
	Gap (2)	4	33.3	4	33.3	0	0			
	Attachment at anatomically normal site	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Yes (0)	0	0	1	8.3	16	100			
	Partially (1)	4	33.3	1	8.3	0	0	0.4621	0.0003	0.0003
	No (2)	8	66.7	10	83.3	0	0			
	Structural appearance of the enthesis	n	%	n	%	n	%			
	Native insertion with tidemark throughout (0)	0	0	0	0	16	100			
	Continuity with bone ingrowth and fibrocartilage and tidemark partially present (1)	2	16.7	0	0	0	0			
	Continuity with bone ingrowth and fibrocartilage but no tidemark (2)	0	0	0	0	0	0	p1	p1	p1
	Continuity with fibrous tissue (3)	6	50	8	66.7	0	0	0.5000	0.0003	0.0003
	Continuity with fat (4)	0	0	0	0	0	0			
	No continuity (5)	4	33.3	4	33.3	0	0			
	Glycosaminoglycans at insertion site	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Normal (0)	0	0	0	0	2	12.5			
	Slight (1)	2	16.7	0	0	13	81.3	0.5000	0.0023	0.0003
	None (2)	10	83.3	12	100	1	6.3			
	Total score (Sum)	n	%	n	%	n	%			
	0	0	0	0	0	2	12.5			
	1	0	0	0	0	13	81.3			
	2	0	0	0	0	1	6.3			
	3	2	16.7	0	0	0	0			
	4	0	0	0	0	0	0	p1	p1	p1
	5	0	0	1	8.3	0	0			
	6	2	16.7	1	8.3	0	0	0.4405	0.0003	0.0003
	7	4	33.3	6	50	0	0			
	8	0	0	0	0	0	0			
	9	0	0	0	0	0	0			
	10	0	0	0	0	0	0			
	11	4	33.3	4	33.3	0	0			

[1] p-value from Exact Wilcoxon

Table S5 : Distribution and frequencies of tendon insertion scores at Day 28 (4 weeks)

	Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Tendon insertion	Attachment	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Complete (0)	11	91.7	9	75	16	100			
	Partial (1)	1	8.3	3	25	0	0	0.2727	0.4286	0.0549
	Gap (2)	0	0	0	0	0	0			
	Attachment at anatomically normal site	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Yes (0)	1	8.3	0	0	16	100			
	Partially (1)	6	50	7	58.3	0	0	0.4481	0.0003	0.0003
	No (2)	5	41.7	5	41.7	0	0			
	Structural appearance of the enthesis	n	%	n	%	n	%			
	Native insertion with tidemark throughout (0)	0	0	0	0	16	100			
	Continuity with bone ingrowth and fibrocartilage and tidemark partially present (1)	0	0	0	0	0	0			
	Continuity with bone ingrowth and fibrocartilage but no tidemark (2)	1	8.3	1	8.3	0	0	p1	p1	p1
	Continuity with fibrous tissue (3)	11	91.7	11	91.7	0	0	0.7727	0.0003	0.0003
	Continuity with fat (4)	0	0	0	0	0	0			
	No continuity (5)	0	0	0	0	0	0			
	Glycosaminoglycans at insertion site	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Normal (0)	1	8.3	1	8.3	2	12.5			
	Slight (1)	0	0	0	0	13	81.3	0.7727	0.0023	0.0023
	None (2)	11	91.7	11	91.7	1	6.3			
	Total score (Sum)	n	%	n	%	n	%			
	0	0	0	0	0	2	12.5			
	1	0	0	0	0	13	81.3			
	2	0	0	0	0	1	6.3			
	3	0	0	1	8.3	0	0			
	4	1	8.3	0	0	0	0	p1	p1	p1
	5	1	8.3	0	0	0	0			
	6	5	41.7	3	25	0	0	0.2565	0.0003	0.0003
	7	5	41.7	8	66.7	0	0			
	8	0	0	0	0	0	0			
	9	0	0	0	0	0	0			
	10	0	0	0	0	0	0			
	11	0	0	0	0	0	0			

[1] p-value from Exact Wilcoxon

Table S6 : Distribution and frequencies of tendon insertion scores at Day 84 (3 months)

	Parameter	Scores CS-FIIa-PRP		Scores Control		Scores Intact (Day 0)		CS-FIIa-PRP vs Control	CS-FIIa-PRP vs Intact	Control vs Intact
Tendon insertion	Attachment	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Complete (0)	10	83.3	9	75	16	100			
	Partial (1)	2	16.7	2	16.7	0	0	0.5000	0.4286	0.1648
	Gap (2)	0	0	1	8.3	0	0			
	Attachment at anatomically normal site	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Yes (0)	6	50	2	16.7	16	100			
	Partially (1)	4	33.3	5	41.7	0	0	0.0368	0.0030	0.0030
	No (2)	2	16.7	5	41.7	0	0			
	Structural appearance of the enthesis	n	%	n	%	n	%			
	Native insertion with tidemark throughout (0)	0	0	0	0	16	100			
	Continuity with bone ingrowth and fibrocartilage and tidemark partially present (1)	1	8.3	2	16.7	0	0			
	Continuity with bone ingrowth and fibrocartilage but no tidemark (2)	6	50	3	25	0	0	p1	p1	p1
	Continuity with fibrous tissue (3)	5	41.7	6	50	0	0	0.3355	0.0003	0.0003
	Continuity with fat (4)	0	0	0		0	0			
	No continuity (5)	0	0	1	8.3	0	0			
	Glycosaminoglycans at insertion site	n	%	n	%	n	%	p1	p1	p1
	Normal (0)	0	0	0	0	2	12.5			
	Slight (1)	3	25	5	41.7	13	81.3	0.2673	0.0043	0.0083
	None (2)	9	75	7	58.3	1	6.3			
	Total score (Sum)	n	%	n	%	n	%			
	0	0	0	0	0	2	12.5			
	1	0	0	0	0	13	81.3			
	2	0	0	1	8.3	1	6.3			
	3	3	25	2	16.7	0	0			
	4	4	33.3	1	8.3	0	0	p1	p1	p1
	5	0	0	1	8.3	0	0			
	6	1	8.3	1	8.3	0	0	0.1829	0.0003	0.0003
	7	4	33.3	5	41.7	0	0			
	8	0	0	0	0	0	0			
	9	0	0	0	0	0	0			
	10	0	0	0	0	0	0			
	11	0	0	1	8.3	0	0			

[1] p-value from Exact Wilcoxon