

Titre: Développement d'un implant à base de chitosane et cellules autologues pour la guérison cutanée

Auteur: Hind Lerhcha

Date: 2025

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Lerhcha, H. (2025). Développement d'un implant à base de chitosane et cellules autologues pour la guérison cutanée [Master's thesis, Polytechnique Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/70450/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/70450/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Marc Lavertu
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Développement d'un implant à base de chitosane et cellules autologues pour la
guérison cutanée**

HIND LERHCHA

Institut de génie biomédical

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

Génie biomédical

Décembre 2025

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Développement d'un implant à base de chitosane et cellules autologues pour la guérison cutanée

présenté par **Hind LERHCHA**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Olivier HENRY, président

Marc LAVERTU, membre et directeur de recherche

Sophie LEROUGE, membre externe

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à Marc LAVERTU, directeur du « Laboratoire des Biomatériaux et du Cartilage » (LBC) et mon directeur de recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce projet. Son encadrement rigoureux, ses conseils avisés et sa disponibilité constante ont grandement contribué à la réussite de cette maîtrise. Je le remercie également pour les nombreuses opportunités académiques et scientifiques qu'il m'a offertes, que ce soit à travers l'obtention de bourses, la participation à des congrès ou l'échange d'idées enrichissantes au sein du laboratoire.

Je tiens également à adresser mes sincères remerciements à Anik CHEVRIER pour son soutien inestimable, son efficacité exemplaire et sa grande réactivité. Son accompagnement, tant dans les aspects expérimentaux et techniques du projet que dans la relecture et la structuration des documents scientifiques, a été d'une aide précieuse tout au long de mon parcours.

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Julie TREMBLAY pour m'avoir formée dès mon arrivée au laboratoire, pour son encadrement rigoureux en lien avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Sa patience, sa pédagogie et sa disponibilité ont grandement facilité mon intégration et la réalisation des expériences de ce projet.

Enfin, j'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à mes collègues et ami·e·s du LBC, Fiona MILANO, Laura AHUNON, Majed GHATTAS, Andréa SKAF et Margaux DELVAUX, pour leur accueil chaleureux, leur entraide constante et leur bonne humeur. Leur présence a rendu les journées de travail et les pauses à JAB à la fois plus légères et mémorables, contribuant à une ambiance de laboratoire conviviale et stimulante.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus chaleureux à mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur patience et leurs encouragements constants tout au long de mon parcours. Leur soutien, tant moral qu'émotionnel, a été ma plus grande source de force et de motivation dans les moments de doute comme dans les réussites. Rien de tout cela n'aurait été possible sans leur confiance et leurs sacrifices, qui m'ont permis d'avancer sereinement sur le chemin que j'ai choisi.

Je tiens également à remercier mon petit frère Rayane, pour sa joie de vivre, son humour et sa bienveillance qui m'ont souvent redonné le sourire après de longues journées de travail. Sa présence et son affection ont été un véritable réconfort et un rappel précieux de l'importance de la famille dans chaque étape de la vie.

Je souhaite également adresser des remerciements tout particuliers à mon cher Elie, pour son soutien indéfectible. Merci pour ta compréhension dans les moments de stress, pour tes encouragements quand la fatigue se faisait sentir, et pour ta confiance inébranlable en moi. Ta bienveillance, ton humour et ton amour ont rendu ce parcours plus doux et plus lumineux.

RÉSUMÉ

Les plaies cutanées représentent un défi important en clinique, particulièrement lorsque leur profondeur, leur organisation ou leur environnement altéré en font des *plaies complexes* nécessitant des stratégies thérapeutiques mieux adaptées. Dans ce contexte, les biomatériaux intégrant des composants bioactifs tels que le chitosane, le fibrinogène et la thrombine suscitent un intérêt croissant. Le chitosane offre des propriétés hémostatiques, antimicrobiennes et régénératives, tandis que le fibrinogène et la thrombine permettent la formation d'une matrice fibrineuse stabilisante pouvant soutenir la migration cellulaire et structurer la réparation tissulaire. L'ajout de sels d'acides gras ioniques comme le FASSmmw est également exploré pour moduler l'environnement cutané et optimiser la régénération.

Le présent mémoire évalue le potentiel d'un implant combinant chitosane, fibrinogène et thrombine (CFT), utilisé avec ou sans cellules cutanées autologues et/ou FASSmmw, dans un modèle d'excision dorsale chez le rat. Six conditions expérimentales ont été comparées, incluant différentes formulations du CFT ainsi que des témoins cellulaires et non cellulaires. Les analyses mécaniques non destructives et histologiques réalisées au jour 14 ont permis d'examiner la progression de la réépithélialisation, l'organisation du tissu de granulation, la présence d'inflammation, la vascularisation, la maturation du collagène et les propriétés mécaniques de la peau en réparation. Les plaies traitées avec la matrice CFT présentaient une réépithélialisation plus avancée, une meilleure organisation du tissu de granulation et une structure tissulaire plus mature que les témoins, indépendamment de l'ajout de cellules ou de FASSmmw. Bien que le collagène restât immature et que plusieurs aspects du remodelage n'étaient pas encore complétés, les propriétés mécaniques des tissus traités se rapprochaient de celles de la peau native, indiquant une récupération fonctionnelle précoce.

Ce mémoire, présenté sous forme d'article scientifique, souligne ainsi le potentiel de la plateforme CFT pour soutenir la régénération cutanée. Toutefois, l'évaluation de son efficacité dans des situations réellement complexes exigera des études supplémentaires, notamment dans des modèles plus sévères ou présentant des altérations physiopathologiques, afin de confirmer et étendre son potentiel thérapeutique.

ABSTRACT

Cutaneous wounds represent a significant clinical challenge, particularly when their depth, structural organization, or disrupted local environment classify them as complex wounds requiring more specialized therapeutic strategies. In this context, biomaterials incorporating bioactive components such as chitosan, fibrinogen, and thrombin are attracting increasing interest. Chitosan provides hemostatic, antimicrobial, and pro-regenerative properties, while fibrinogen and thrombin enable the formation of a stabilizing fibrin matrix capable of supporting cell migration and guiding tissue repair. The addition of ionic fatty acid salts such as FASSmmw is also being explored to modulate the cutaneous environment and optimize regeneration.

This thesis evaluates the potential of an implant combining chitosan, fibrinogen, and thrombin (CFT), used with or without autologous skin cells and/or FASSmmw, in a dorsal excisional wound model in rats. Six experimental conditions were compared, including different CFT formulations as well as cellular and non-cellular controls. Non-destructive mechanical testing and histological analyses performed on day 14 were used to assess re-epithelialization, granulation tissue organization, inflammation, vascularization, collagen maturation, and the mechanical properties of the healing skin. Wounds treated with the CFT matrix exhibited more advanced re-epithelialization, improved granulation tissue organization, and a more mature tissue structure than the controls, regardless of the addition of cells or FASSmmw. Although collagen remained immature and several aspects of remodeling were still incomplete, the mechanical properties of treated tissues approached those of native skin, indicating early functional recovery.

This thesis, presented in the form of a scientific article, therefore highlights the potential of the CFT platform to support cutaneous regeneration. However, assessing its effectiveness in truly complex wound settings will require additional studies, particularly in more severe models or those exhibiting altered physiopathological conditions, in order to confirm and extend its therapeutic potential

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
LISTE DES ANNEXES.....	XVII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 La structure de la peau	4
2.2 La cicatrisation cutanée : mécanismes physiologiques	7
2.2.1 Les quatre phases : hémostase, inflammation, prolifération, remodelage	7
2.2.2 Facteurs influençant la cicatrisation	10
2.2.3 Types de plaies cutanées	11
2.3 Les approches thérapeutiques existantes	15
2.3.1 Traitements classiques.....	15
2.3.2 Limites cliniques et scientifiques des traitements conventionnels.....	16
2.4 L'ingénierie tissulaire appliquée à la peau	17
2.4.1 Principes de l'ingénierie tissulaire cutanée	17
2.4.2 Biomatériaux utilisés en cicatrisation	18
2.4.3 Intégration de cellules autologues dans les implants	20
2.5 Le chitosane comme biomatériau prometteur	22
2.5.1 Origine, propriétés physico-chimiques et biologiques	22

2.5.2	Rôles du chitosane dans la cicatrisation cutanée.....	24
2.5.3	Limites du chitosane seul et besoins d'optimisation.....	26
2.6	Thrombine.....	28
2.7	Fibrinogène.....	31
2.8	Acide Gras.....	32
2.9	Cellules autologues et régénération cutanée	33
2.9.1	Intérêt des kératinocytes et fibroblastes autologues	33
2.9.2	Méthodes d'isolement et viabilité	35
2.9.3	Systèmes de livraison cellulaire : exemple de RECELL.....	36
2.10	Thérapie combinée chitosane + cellules autologues	37
2.10.1	Justification scientifique et biomédicale	37
2.10.2	Innovations	38
2.11	Modèles expérimentaux	39
2.11.1	Modèles in vitro	39
2.11.2	Modèles in vivo.....	42
2.11.3	Paramètres évalués	43
CHAPITRE 3	ARTICLE 1: CHITOSAN-FIBRINOGEN-THROMBIN MATRIX ACCELERATES RE-EPITHELIALIZATION AND CORNIFICATION IN A RAT WOUND HEALING MODEL.	47
3.1	Préambule: Étude Préliminaire.....	47
3.2	Introduction	51
3.3	Methods.....	53
3.3.1	Model and study design.....	53
3.3.2	Mechanical Analysis	58
3.3.3	Histology	58

3.3.4	Statistical analysis	60
3.4	Results	61
3.4.1	CFT Matrix Formed a Protective Barrier on Top of Wounds and Re-Epithelialization Occurred Underneath	61
3.4.2	Chitosan Persisted within the Granulation Tissue until Day 14.....	62
3.4.3	All Treated Wounds Exhibited Structural Abnormalities at Day 14	63
3.4.4	Re-Epithelialization and Cornification Were Accelerated in Wounds Treated with CFT Matrix at Day 14	67
3.4.5	Increased Vascularization was Found in the Granulation Tissue of Jelly and Cells Groups at Day 14; CD68 expression was increased in all groups compared to native skin ..	68
3.4.6	Collagen Maturation was Incomplete in All Groups at Day 14	72
3.4.7	Mechanical Properties were Similar to Native Skin in All Groups	73
3.5	Discussion	74
3.6	Author contributions	78
3.7	Acknowledgements	78
3.8	Competing interests.....	79
3.9	Data availability	79
CHAPITRE 4	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	80
4.1	Synthèse générale.....	80
4.2	Limites de l'étude.....	81
4.3	Améliorations futures.....	82
RÉFÉRENCES.....		84
ANNEXE		97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Synthèse des facteurs liés au retard de guérison des plaies complexes, adaptée de Marques et al. (2023).	13
Table 3.1 Experimental groups.	56
Table 3.2 Microscopic scoring of rat skin	59
Tableau A.4.1 Scores histologiques	99

LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1 Structure de l'épiderme. Illustration schématique montrant l'organisation stratifiée de l'épiderme, comprenant le stratum basal, le stratum spinosum, le stratum granulosum, le stratum lucidum et le stratum corneum constitué de cellules kératinisées. Figure créée avec BioRender.com..... 5
- Figure 2.2 Organisation structurelle de la peau humaine : Illustration schématique des trois principales couches cutanées ainsi que de leurs structures associées. *Créé avec BioRender.com* 7
- Figure 2.3 Les quatre phases du processus de cicatrisation cutanée. (1) hémorragie et hémostase; (2) inflammation, avec infiltration de neutrophiles, de macrophages et migration initiale des cellules épithéliales ; (3) prolifération, marquée par l'activation des fibroblastes et la formation du tissu de granulation ; (4) remodelage, durant lequel le tissu cicatriciel se réorganise et se stabilise. *Créé avec BioRender.com.* 8
- Figure 2.4 Phases distinctes et chevauchantes de la cicatrisation cutanée. 10
- Figure 2.5 Photographies cliniques représentatives de plaies chroniques typiques. Ulcération diabétique associée à une neuropathie et à une insuffisance artérielle avec amputation antérieure de l'avant-pied, ulcère veineux avec lipodermatosclérose sur la face médiale de la cheville, ulcère de décubitus profond (escarre) de la région sacrée, ulcère diabétique neuropathique plantaire chez un patient présentant un pied de Charcot, et ulcération étendue de la jambe inférieure d'origine veineuse et lymphatique combinée. Reproduit à partir de Falanga et al., *Nature Reviews Disease Primers* (2022). Sous licence CC BY 4.0. (Falanga et al., 2022)..... 12
- Figure 2.6 Représentation schématique de différentes formes chimiques de chitosane. Créé par Biorender.com. 19
- Figure 2.7 Représentation schématique de la stratégie utilisée pour générer une construction épidermique–dermique. Le polycation (poly-L-lysine) et le polyanion (acide hyaluronique) sont appliqués par pulvérisation sur un échafaudage poreux d'acide hyaluronique, formant une membrane en couches successives (layer-by-layer). Cette membrane joue le rôle de

composant épidermique, tandis que l'échafaudage poreux sous-jacent constitue le composant dermique. Des kératinocytes sont ensuite déposés sur la membrane pour établir un monocouche cellulaire. Reproduit avec permission de Wiley. Licence n° 6153770844249 (Monteiro et al., 2015)..... 20

Figure 2.8 Représentation schématique du potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC). *Illustration réalisée avec BioRender.com.* 21

Figure 2.9 Utilisation des biomatériaux à base de chitosane pour la régénération tissulaire. Le chitosane peut être formulé seul ou en combinaison avec des polymères naturels ou synthétiques, des composés inorganiques et des agents thérapeutiques, sous diverses formes telles que des échafaudages, des hydrogels, des membranes et des nanoparticules. Ces biomatériaux ont démontré leur capacité à favoriser la régénération et la réparation de différents tissus, notamment osseux, cartilagineux, dentaires, cutanés, cardiaques et nerveux. Reproduit à partir de Kim Y. et al., *Pharmaceutics* (2023). Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). (Y. Kim et al., 2023)..... 24

Figure 2.10 Effet de l'application de différentes formes de biomatériaux à base de chitosane sur les lésions cutanées. Diverses formulations de matériaux à base de chitosane sont étudiées pour le traitement des plaies cutanées, notamment les hydrogels, les membranes, les gels topiques, les éponges, entre autres. En raison des propriétés physico-chimiques du chitosane, ces biomatériaux agissent à toutes les étapes du processus de cicatrisation, en favorisant la réparation cutanée, en réduisant la fibrose et en exerçant des effets anti-inflammatoires, antibactériens et pro-prolifératifs. Reproduit à partir de Kim Y. et al., *Pharmaceutics* (2023). Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). (Y. Kim et al., 2023)..... 26

Figure 2.11 Illustration schématique du rôle de la thrombine dans la cicatrisation cutanée. À la suite d'une lésion tissulaire, les fibroblastes sont activés par les cytokines pro-inflammatoires, puis se transforment progressivement en myofibroblastes. En parallèle, la thrombine générée au site de la lésion clive le fibrinogène, conduisant à la formation d'un réseau de fibrine qui stabilise le caillot et sert de matrice provisoire pour la réparation tissulaire. Schéma réalisé avec BioRender.com. 28

Figure 2.12 Effet du peptide thrombinique TP508 sur la fermeture de plaies cutanées pleine épaisseur chez le rat. Des excisions circulaires de 2 cm de diamètre ont été réalisées par paires sur le dos de rats, en traversant le pannicule charnu afin d'exposer le fascia et la couche musculaire sous-jacente. Chaque animal a reçu, sur un côté, une application topique unique de 40 μ L de solution saline (contrôle) et, sur l'autre côté, 40 μ L de solution contenant 0,4 μ g de TP508. Les mêmes animaux ont ensuite été anesthésiés légèrement et photographiés aux jours indiqués pour suivre l'évolution de la fermeture des plaies. *Reproduit avec permission (Licence n° 6153800293118) à partir de Stiernberg et al., "Acceleration of full-thickness wound healing in normal rats by the synthetic thrombin peptide TP508", Wound Repair and Regeneration, 2000.* 30

Figure 2.13 Représentation schématique du processus de cicatrisation cutanée et des cellules impliquées à chaque phase. Reproduit à partir de Tottoli E.M., Dorati R., Genta I., Chiesa E., Pisani S., Conti B., « Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration », *Pharmaceutics* (2020), 12(8) : 735. DOI: 10.3390/pharmaceutics12080735. Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). (Tottoli et al., 2020)..... 34

Figure 2.14 Images optiques d'un modèle de peau humaine équivalente (HSE) et de son traitement. Le modèle HSE intact, la plaie créée, et l'application d'échafaudages à base de chitosane sont présentés, ainsi que des images MTT et H&E après 14 jours de traitement par des échafaudages nanofibreux à base de chitosane ou chitosane-collagène. L'encart montre un agrandissement de la zone d'intérêt. Reproduit à partir de Sarkar et al., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2013), avec permission de Wiley . No. 6138901110097. (Sarkar et al., 2013)..... 41

Figure 2.2.15 Schéma du protocole expérimental chez l'animal. Les cellules ont été déposées sur les plaies, qui ont ensuite été recouvertes d'un gel d'acide hyaluronique (HA) et/ou d'une membrane de chitosane poreuse et d'une gaze. Les animaux ont été répartis en sept groupes recevant un traitement témoin, le gel HA seul, des cellules ASC (cellules uniques ou sphéroïdes) recouvertes de gel HA, ou ces mêmes conditions combinées à une membrane de chitosane. Reproduit avec permission (licence n° 502031460). (Hsu & Hsieh, 2015)..... 43

- Figure 2.16 Schéma récapitulatif du modèle mécanobiologique systémique développé pour la cicatrisation cutanée. Ce modèle vise à représenter l'évolution temporelle des principales variables biochimiques, microstructurales ainsi que des paramètres mécaniques et géométriques macroscopiques, en intégrant les voies de régulation cellulaires et tissulaires et leurs interactions à différentes échelles structurelles. Reproduit à partir de Pensalfini M., Tepole A.B., *PLOS Computational Biology* (2023). Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (Pensalfini & Tepole, 2023). 45
- Figure 3.1 Macroscopic view of rat N at day 18 post-injury, showing detachment of the splint from the left wound site. 50
- Figure 3.2 Preparation and delivery of formulations for wound treatment in rats. (1) Lyophilized chitosan (C) was reconstituted with water for injection and thrombin (T). (2) Autologous cell suspensions were isolated and combined with fibrinogen (F) and FASSmmw solution before mixing. (3) The two components (C+T and cells+F+FASSmmw) were combined using a double-syringe system equipped with a static mixer and delivered directly into excisional wounds surrounded by retaining stainless steel rings. Figure created with Biorender. 57
- Figure 3.3 Macroscopic images of wounds treated with CFT Cells+ FASSmmw+, CFT Cells- FASSmmw-, Jelly and Cells. MT-stained histological images of these same samples showing re-epithelialization underneath the CFT matrix that was much less abundant in the Jelly and Cells groups. Black arrowheads point to neo-epidermis. 62
- Figure 3.4 White arrow points to rhodamine-chitosan particles in the mid to bottom part of the dermis in a wound treated with CFT Cells+ FASSmmw+. White arrowhead points to neo-epidermis. 63
- Figure 3.5 H&E-stained sections of treated wounds and native skin. Double arrows show the margins of the wounds and insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. Black arrow points to inflammatory infiltrate and black arrowheads point to appendages within the newly formed dermis. 65
- Figure 3.6 Best-worst MT-stained sections from the groups treated with Jelly and Cells and CFT-treated groups and a section from native skin. Double arrows show the wound margins and insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. 66

- Figure 3.7 Histological scores for the different treatment groups compared to native skin. Each data point represents a single wound, and all graphs display average values $\pm$ SD. n = 6 or 7 wounds per group. * $p < 0.1$ and ** $p < 0.05$ 68
- Figure 3.8 CD31-immunostained sections from the different treatment groups. Double arrows show the wound margins and insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. % Area of CD31-positive tissues is shown in the graph. n = 6 or 7 per group. * $p < 0.1$ and ** $p < 0.05$ 70
- Figure 3.9 CD68-immunostained sections from the different treatment groups. Double arrows show the wound margins and insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. % Area of CD68-positive tissues is shown in the graph. n = 6 or 7 per group. * $p < 0.1$ 71
- Figure 3.10 Picrosirius red-stained sections from the different treatment groups. Insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. Ratio of mature to immature collagen is shown in the graph. n = 6 or 7 per group. ** $p < 0.05$ 73
- Figure 3.11 Mechanical testing data for the test article CFT Cells+ ING+ versus control groups and native skin. n = 6 or 7 per group. 74
- Figure A.4.1 Immunomarquage de l'élastase neutrophilique, de l'arginase-1 et du CD68. La tête de flèche noire indique un vaisseau sanguin et la flèche noire indique un follicule pileux, tous deux observés dans la peau native. Les panneaux CD68 illustrent des plaies présentant un contenu élevé, intermédiaire et faible en cellules exprimant le CD68. Les encarts dans les images à faible grossissement indiquent les zones à partir desquelles les images à plus fort grossissement ont été acquises. 97
- Figure A.4.2 Courbe force-déplacement représentative générée par le système d'essais mécaniques Mach-1 lors d'un test d'indentation non destructif sur un échantillon de peau. La courbe illustre l'évolution de la force normale (Fz) en fonction de la position verticale de l'indenteur (z). Les paramètres mécaniques extraits automatiquement par le logiciel, incluant la force maximale (Fmax), la rigidité apparente et l'épaisseur locale du tissu, sont présentés à titre illustratif. Cette figure est fournie à titre d'exemple des données mécaniques brutes générées par le système Mach-1 et utilisées pour les analyses mécaniques ultérieures dans cette étude. 98

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANG	Angiogenèse
BPL	Bonnes Pratiques de Laboratoire
CaM	Calmoduline
CD31	Cluster of Differentiation 31 (marqueur endothélial)
CTF	Chitosane-Thrombine-Fibrinogène
CFT	Chitosan-Fibrinogen-Thrombin (terme anglais équivalent)
ECM / MEC	Extracellular Matrix / Matrice Extracellulaire
FGF	Fibroblast Growth Factor (facteur de croissance des fibroblastes)
H&E	Coloration Hématoxyline-Éosine
FASSmmw	Sel d'acide gras sodique (acide gras ionique expérimental)
MSCs / CSM	Mesenchymal Stem Cells / Cellules Souches Mésenchymateuses
MMPs	Matrix Metalloproteinases (métalloprotéinases matricielles)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (solution tampon phosphate)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
SD	Standard Deviation (écart-type)
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α-SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin (actine musculaire lisse alpha)

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE	97
--------------	----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La cicatrisation cutanée est un processus physiologique dynamique, coordonné et essentiel qui assure la restauration de l'intégrité de la barrière cutanée après une lésion. Elle repose sur une succession ordonnée d'événements cellulaires et moléculaires comprenant l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage. Lorsque ce processus est perturbé, les plaies peuvent évoluer défavorablement et nécessiter des approches thérapeutiques spécifiques. Certaines plaies, en raison de leur profondeur, de leur organisation tissulaire ou de leur environnement altéré, deviennent des plaies complexes et représentent alors un défi clinique important, requérant des stratégies adaptées pour soutenir la régénération tissulaire (Huang et al., 2023) (Akhtari et al., 2024; Singer, 2022).

Les approches thérapeutiques conventionnelles, incluant les pansements, les agents topiques, la thérapie par pression négative ou les greffes cutanées, présentent plusieurs limites telles qu'une efficacité variable, l'absence de restauration fonctionnelle complète, des coûts élevés et un manque de standardisation clinique (Kolimi et al., 2022). L'introduction de dispositifs cellulaires autologues a tenté de pallier ces limites. Parmi eux, RECELL® a démontré sa capacité à améliorer la réépithélialisation. Toutefois, son utilisation demeure restreinte par des contraintes techniques, notamment une perte cellulaire importante lors de l'application et une distribution hétérogène des cellules sur la plaie (Holmes et al., 2019; Iv et al., 2018). Apligraf® est un substitut cutané bi-couche composé de fibroblastes néonataux intégrés dans un collagène bovin et recouverts de kératinocytes néonataux, conçu pour traiter les ulcères veineux et les ulcères du pied diabétique qui ne répondent pas aux thérapies standards. Bien qu'il ait démontré une efficacité supérieure à la prise en charge conventionnelle, notamment en accélérant la fermeture des plaies, en réduisant la douleur et en diminuant les risques d'ostéomyélite ou d'amputation, ce traitement présente certaines limites. La réussite de ce traitement repose également sur une préparation rigoureuse du lit de la plaie, incluant débridement et contrôle de l'infection, et Apligraf ne doit pas être appliqué sur une plaie infectée. Sa persistance est limitée, les cellules ne survivant généralement pas plus de quatre semaines, et plusieurs applications peuvent être nécessaires, bien que les patients nécessitant plus de trois applications ne bénéficient généralement pas davantage. Enfin, malgré ses bénéfices,

son coût élevé et la nécessité d'un suivi strict représentent aussi des contraintes importantes(Zaulyanov & Kirsner, 2007).

Dans la recherche de solutions plus performantes, les biomatériaux naturels suscitent un intérêt croissant. Le chitosane, polysaccharide dérivé de la chitine, constitue un candidat prometteur grâce à sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, ses propriétés antimicrobiennes et son potentiel régénératif. Utilisé avec des cellules cutanées autologues comme les kératinocytes ou les fibroblastes, il offre un environnement favorable à la régénération tout en limitant les risques immunologiques. Toutefois, son efficacité peut être modulée selon ses caractéristiques physicochimiques, et son association à d'autres composants biologiques permet d'amplifier ses effets(Aranaz et al., 2021; Y. Kim et al., 2023).

Le fibrinogène et la thrombine jouent également un rôle important dans la réparation cutanée. Leur interaction entraîne la formation d'un réseau de fibrine stabilisant le caillot et constituant une matrice provisoire facilitant la migration cellulaire, l'organisation du tissu de granulation et l'angiogenèse. Dans le contexte de l'ingénierie cutanée, la thrombine contribue non seulement à la coagulation rapide du biomatériau, mais elle influence aussi la réponse inflammatoire, stimule les fibroblastes et favorise la néovascularisation via la libération de facteurs pro-angiogéniques(Gugerell et al., 2014; Mogford et al., 2009).

L'ajout d'un sel d'acide gras expérimental, le FASSmmw, est exploré pour optimiser davantage l'environnement cutané. Les acides gras ont en effet été associés à la modulation de l'inflammation, à la stimulation de la migration cellulaire et à la promotion de l'angiogenèse, ce qui en fait des candidats intéressants pour compléter les formulations biomatériales(Ribeiro Barros Cardoso et al., 2004).

Sur cette base, notre projet repose sur l'hypothèse qu'un implant combinant chitosane, fibrinogène, thrombine, cellules autologues et sel d'acide gras (FASSmmw) permettrait d'augmenter la rétention cellulaire, d'améliorer leur viabilité locale, et d'accélérer la cicatrisation cutanée. Ce biomatériau, désigné CFT, est évalué dans un modèle de plaie par excision dorsale chez le rat afin de caractériser son impact sur la régénération cutanée et de déterminer si l'ajout de cellules et/ou d'acide gras offre un bénéfice supplémentaire.

L'objectif général consiste à examiner si cette matrice biomatériale peut améliorer la cicatrisation cutanée en modulant l'organisation du tissu de granulation, la réépithélialisation, la vascularisation, l'inflammation et la qualité mécanique du tissu néoformé. Plus spécifiquement, ce travail cherche à comparer différentes formulations du CFT, avec ou sans cellules autologues et/ou FASSmmw, à analyser l'évolution histologique et mécanique du tissu réparé au jour 14, et à établir l'impact relatif de chaque composant sur la qualité de la régénération cutanée.

La préparation des figures schématiques a été réalisée avec la plateforme BioRender.com, les analyses et graphiques statistiques ont été effectués avec le logiciel GraphPad Prism, et la reformulation syntaxique du texte a été effectuée avec l'assistance de ChatGPT, sans ajout d'informations externes.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La structure de la peau

La peau constitue l'organe le plus étendu du corps humain et recouvre toute la surface externe de l'organisme. Elle est organisée en trois couches principales, l'épiderme, le derme et l'hypoderme, qui se distinguent nettement par leur constitution et leurs fonctions. L'ensemble forme un système tissulaire complexe assurant la première ligne de défense contre les agents pathogènes, les rayonnements ultraviolets, les substances chimiques et les agressions mécaniques. La peau contribue également à la régulation thermique, au contrôle des pertes hydriques et à diverses fonctions sensorielles essentielles (Yousef et al., 2019).

L'épiderme représente la couche la plus superficielle et se caractérise par une architecture stratifiée comprenant, de la profondeur vers la surface, le stratum basal, le stratum spinosum, le stratum granulosum, le stratum lucidum lorsqu'il est présent, et le stratum corneum. Ces strates correspondent à des étapes successives de différenciation des kératinocytes, qui migrent progressivement de la membrane basale vers la surface cutanée. Le stratum corneum occupe une place centrale dans la fonction barrière : il est constitué de cellules kératinisées dépourvues de noyau formant une couche protectrice hautement résistante à la perte d'eau et à la pénétration de substances extérieures (Wickett & Visscher, 2006).

Structure of the Epidermis

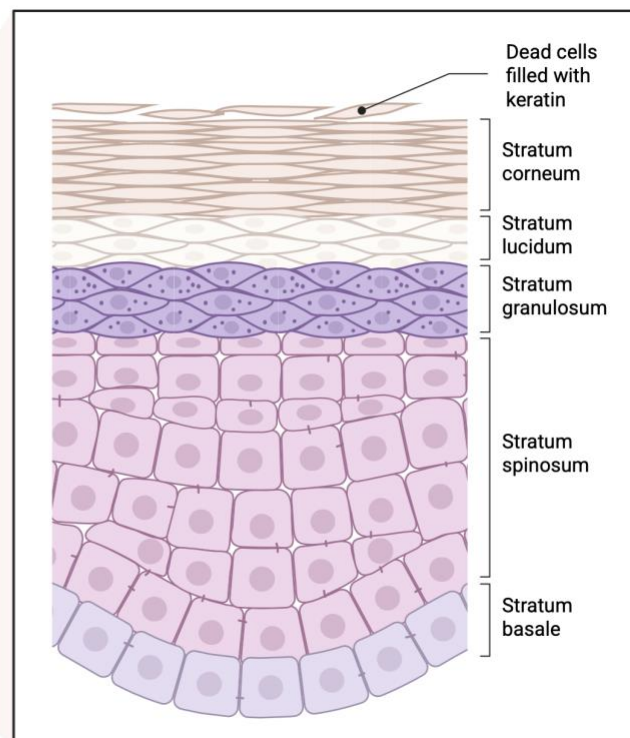


Figure 2.1 Structure de l'épiderme. Illustration schématique montrant l'organisation stratifiée de l'épiderme, comprenant le stratum basal, le stratum spinosum, le stratum granulosum, le stratum lucidum et le stratum corneum constitué de cellules kératinisées. Figure créée avec BioRender.com.

L'épiderme regroupe plusieurs types cellulaires spécialisés. Les kératinocytes, majoritaires, produisent la kératine et participent à la formation de la barrière hydrophobe en sécrétant des lipides qui se déposent dans les couches superficielles. Les mélanocytes, situés dans le stratum basal, synthétisent la mélanine et la transfèrent aux kératinocytes voisins, un processus déclenché notamment par les UV. Cette pigmentation joue un rôle essentiel dans la protection nucléaire contre les dommages induits par les rayonnements. Les cellules de Langerhans, localisées surtout dans le stratum spinosum, ont une fonction immunitaire centrale et interviennent dans la reconnaissance antigénique. Enfin, les cellules de Merkel, présentes dans la couche basale, assurent une sensibilité tactile fine grâce à leur interaction avec les terminaisons nerveuses (de Szalay & Wertz, 2023).

Situé sous l'épiderme, le derme forme une couche conjonctive plus épaisse, reliée à celui-ci au niveau de la membrane basale. Il se compose d'une zone papillaire superficielle constituée d'un tissu conjonctif lâche, et d'une zone réticulaire plus profonde caractérisée par des faisceaux de fibres de collagène plus denses. Cette organisation assure à la fois résistance mécanique et souplesse. Le derme contient un réseau vasculaire qui soutient métaboliquement l'épiderme dépourvu de vaisseaux, ainsi que des structures annexes telles que les follicules pileux, les glandes sudoripares, les récepteurs sensoriels et certains muscles cutanés.

L'hypoderme, également appelé tissu sous-cutané, constitue la couche la plus profonde. Il est principalement formé de lobules adipeux séparés par des cloisons conjonctives et renferme certains prolongements de structures vasculaires, nerveuses ou annexielles. Sa composition lui permet de remplir des fonctions de réserve énergétique, d'amortissement mécanique et d'isolation thermique. Il assure également une transition avec les tissus profonds, tout en contribuant à l'ancrage de la peau au reste du corps (Wickett & Visscher, 2006; Yousef et al., 2019).

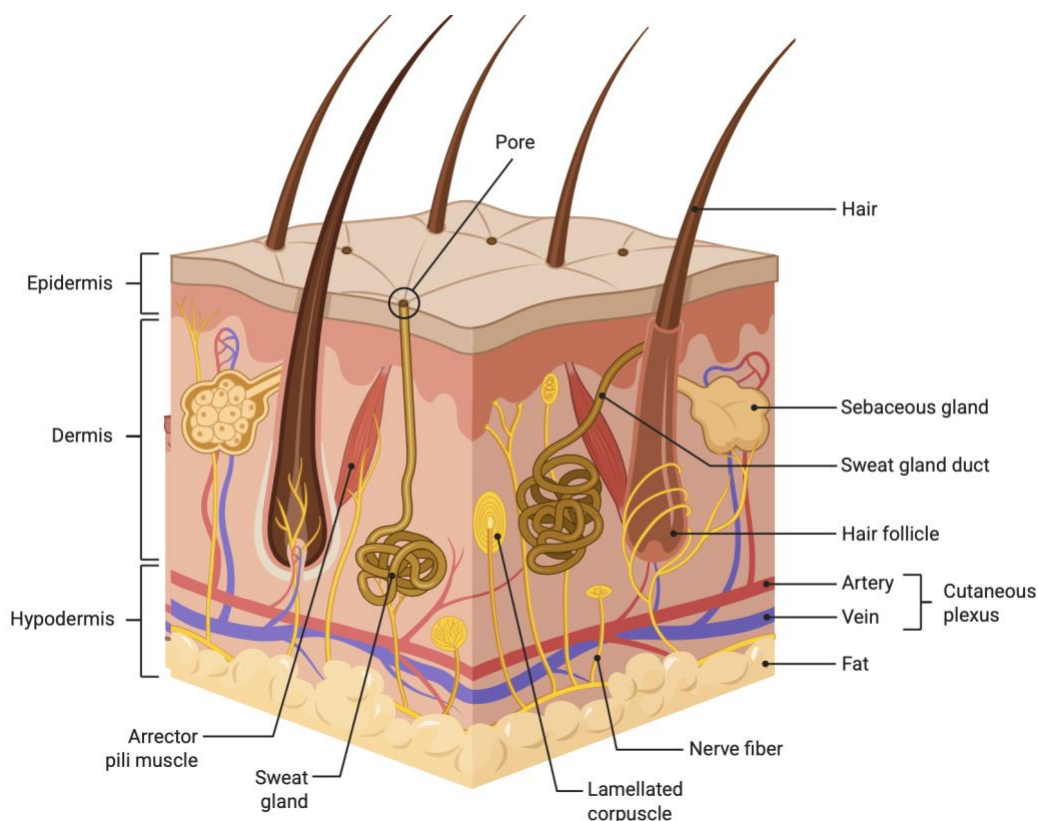


Figure 2.2 Organisation structurale de la peau humaine : Illustration schématique des trois principales couches cutanées ainsi que de leurs structures associées. *Créé avec BioRender.com*

2.2 La cicatrisation cutanée : mécanismes physiologiques

2.2.1 Les quatre phases : hémostase, inflammation, prolifération, remodelage

La cicatrisation cutanée est un processus dynamique, complexe et finement régulé, essentiel pour restaurer l'intégrité de la barrière cutanée après une lésion. Elle s'organise en quatre phases principales : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage. Elles ne sont pas strictement séquentielles mais se chevauchent partiellement dans le temps. (Huang et al., 2023; Ny et al., 2020).

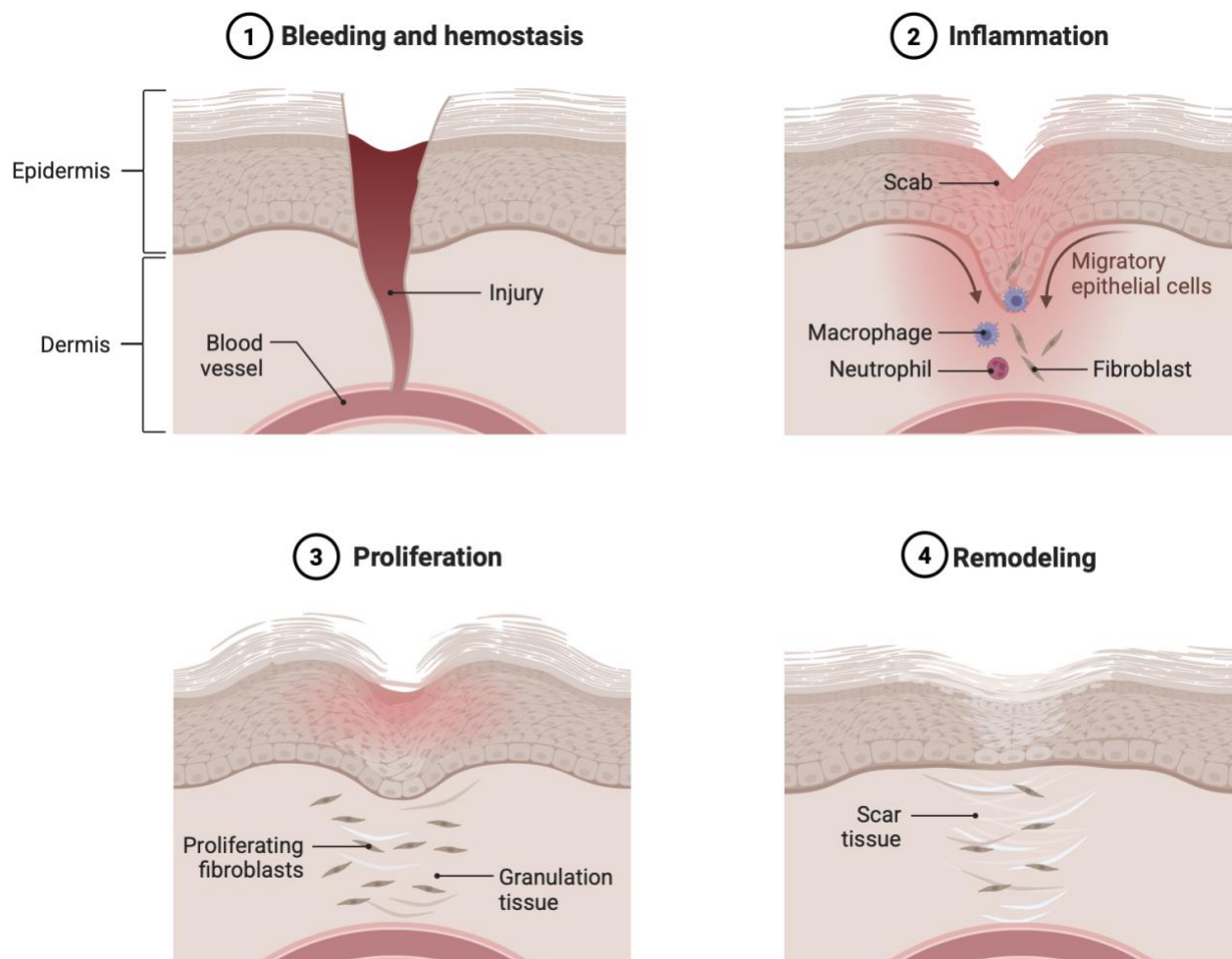


Figure 2.3 Les quatre phases du processus de cicatrisation cutanée. (1) hémorragie et hémostase; (2) inflammation, avec infiltration de neutrophiles, de macrophages et migration initiale des cellules épithéliales ; (3) prolifération, marquée par l'activation des fibroblastes et la formation du tissu de granulation ; (4) remodelage, durant lequel le tissu cicatriciel se réorganise et se stabilise. Créé avec BioRender.com.

L'hémostase est la première réponse immédiate à la blessure. Elle est initiée dans les minutes suivant la rupture de l'endothélium vasculaire. Les plaquettes sont activées et déclenchent la cascade de coagulation, formant un caillot de fibrine qui stabilise le site de la blessure, prévient les pertes sanguines et constitue une matrice initiale pour la migration cellulaire. Par ailleurs, ce caillot joue aussi un rôle dans la libération de médiateurs bioactifs comme le PDGF (Facteur de croissance dérivé des plaquettes), le TGF- β (Facteur de croissance transformant bêta) et les

facteurs de croissance endothéliaux (VEGF), qui vont influencer les phases suivantes (Singer, 2022)(Mamun et al., 2024).

Vient ensuite la phase inflammatoire, cruciale pour le nettoyage de la plaie. Cette phase est marquée par l'infiltration des neutrophiles en première ligne, suivis par les monocytes qui se différencient en macrophages. Les neutrophiles dégradent les tissus nécrotiques et libèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS), tandis que les macrophages assurent une transition vers un environnement de réparation en sécrétant des cytokines pro- (IL-6, TNF- α) puis anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) lors de leur passage du phénotype M1 au phénotype M2. Cette orchestration complexe permet de préparer la plaie pour l'étape suivante (Larouche et al., 2018; Mamun et al., 2024).

La phase proliférative est caractérisée par plusieurs événements clés : la migration et la prolifération des kératinocytes, l'angiogenèse, et la formation du tissu de granulation riche en fibroblastes et en matrice extracellulaire MEC (collagène, fibronectine). L'angiogenèse est stimulée par des facteurs comme le VEGF, libéré par les cellules endothéliales et les macrophages M2. Parallèlement, les fibroblastes activés synthétisent la MEC et soutiennent l'adhésion cellulaire. Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) et leurs exosomes contribuent également à cette phase en régulant l'activation des kératinocytes et des fibroblastes (Singer, 2022)(Kolimi et al., 2022).

Enfin, la phase de remodelage débute lorsque le tissu de granulation est suffisamment développé. Cette étape dure plusieurs semaines à plusieurs mois selon le type de plaie. Elle implique la maturation du collagène, principalement par conversion du collagène de type III en type I, la réorganisation des fibres, et l'apoptose des cellules endothéliales et des fibroblastes excédentaires. L'objectif est de restaurer une architecture tissulaire stable et fonctionnelle. Cependant, la peau régénérée présente souvent une résistance mécanique et une pigmentation inférieures à la peau native (Kolimi et al., 2022; Singer, 2022).

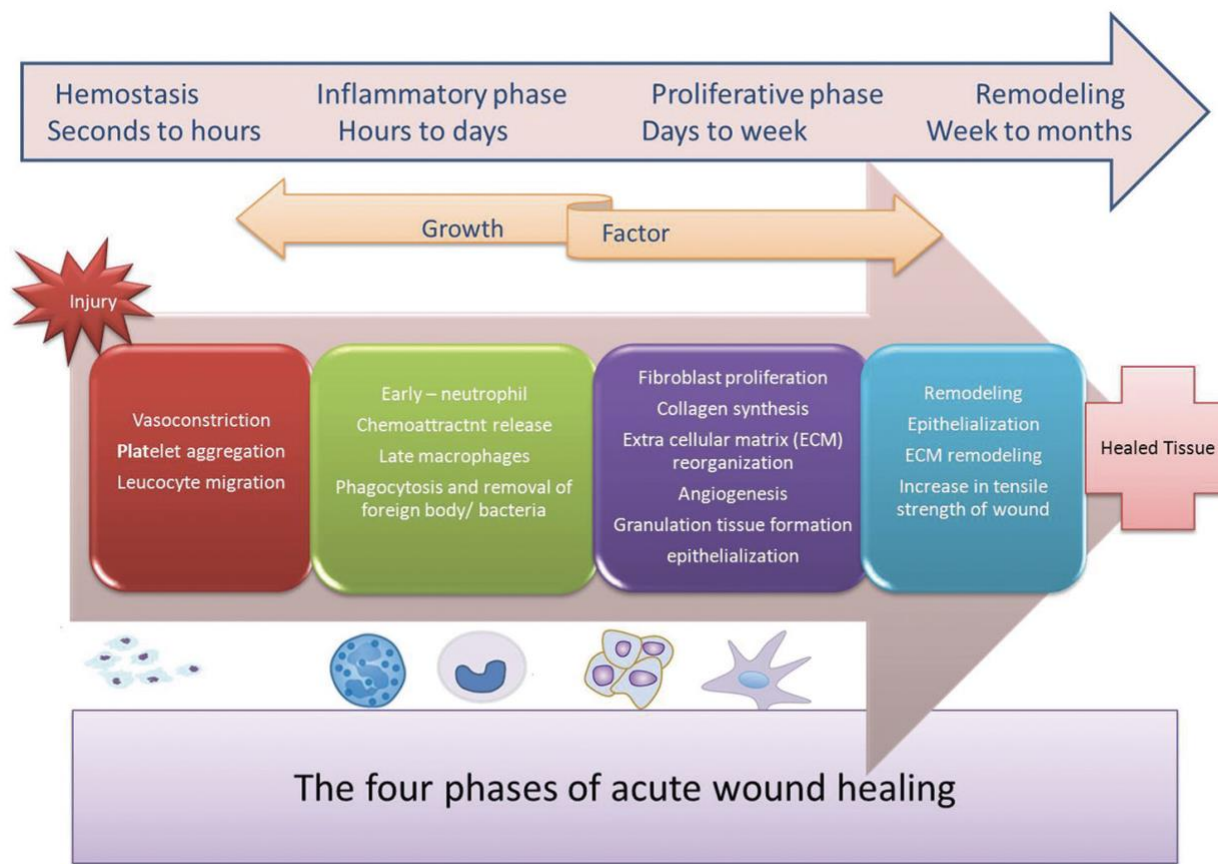


Figure 2.4 Phases distinctes et chevauchantes de la cicatrisation cutanée. Reproduit à partir de Thiruvoth F.M., Mohapatra D.P., Sivakumar D.K., Chittoria R.K., Nandhagopal V., « Current concepts in the physiology of adult wound healing », Plastic and Aesthetic Research (2015), 2 : 250–256. DOI : 10.4103/2347-9264.158851. Sous licence Creative Commons Attribution–NonCommercial–ShareAlike 3.0 (CC BY-NC-SA 3.0). (Thiruvoth et al., 2015).

2.2.2 Facteurs influençant la cicatrisation

Le déroulement de ces étapes est soumis à l'influence de facteurs locaux et systémiques. Parmi les facteurs locaux, on retrouve : l'infection, la déshydratation, l'hypoxie tissulaire, la charge bactérienne et fongique, l'accumulation de ROS, ainsi que l'exposition prolongée aux cytokines pro-inflammatoires telles que $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$. L'accumulation excessive de MMPs (matrix metalloproteinases) peut aussi dégrader la MEC et empêcher une bonne organisation tissulaire, notamment dans les plaies chroniques (Akhtari et al., 2024).

Du point de vue systémique, le vieillissement, le diabète sucré, les maladies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale, ou encore l'immunodépression ralentissent fortement le processus de cicatrisation. Le diabète, en particulier, est associé à une altération de la réponse macrophagique, à un stress oxydatif élevé et à des troubles vasculaires, menant à la formation d'ulcères chroniques résistants aux traitements.

Enfin, des facteurs mécaniques et environnementaux comme la pression continue (ex. escarres), la friction, ou la température locale peuvent également ralentir la cicatrisation, en entretenant un état inflammatoire ou en limitant la perfusion locale (Akhtari et al., 2024; Ge & Wang, 2023).

2.2.3 Types de plaies cutanées

Dans la littérature, il n'existe pas de classification spécifique et universelle des plaies cutanées, car leur catégorisation dépend de nombreux facteurs liés à la nature de la lésion, à son évolution et au contexte clinique dans lequel elle survient. Parmi les différentes façons possibles de distinguer les types de plaies, il est possible de prendre à titre d'exemple la distinction entre plaies aiguës et plaies chroniques, fondée sur leur capacité à progresser normalement à travers les phases physiologiques de cicatrisation. Une autre approche consiste à identifier les plaies complexes, caractérisées par la présence de facteurs défavorables qui compromettent leur guérison et les placent à haut risque de retard ou de non-cicatrisation (*Outcomes and Characteristics of Wound Healing in an Outpatient Physical Therapy Clinic*, 2020; *Wound Classification*, n.d.; Percival, 2002).

Les plaies aiguës correspondent à des lésions dont la progression suit le déroulement physiologique attendu des différentes phases de cicatrisation. Elles traversent successivement l'inflammation, la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire, avec une coordination efficace des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. À l'inverse, les plaies chroniques se distinguent par une incapacité à avancer normalement dans ces étapes. Ces plaies restent souvent coincées dans une phase inflammatoire prolongée, caractérisée par un déséquilibre des signaux cellulaires et une persistance d'un microenvironnement non favorable à la réparation. Ce dysfonctionnement entraîne une cicatrisation lente, imparfaite et fréquemment désorganisée (Singer, 2022).



Figure 2.5 Photographies cliniques représentatives de plaies chroniques typiques. Ulcération diabétique associée à une neuropathie et à une insuffisance artérielle avec amputation antérieure de l'avant-pied, ulcère veineux avec lipodermatosclérose sur la face médiale de la cheville, ulcère de décubitus profond (escarre) de la région sacrée, ulcère diabétique neuropathique plantaire chez un patient présentant un pied de Charcot, et ulcération étendue de la jambe inférieure d'origine veineuse et lymphatique combinée. Reproduit à partir de Falanga et al., *Nature Reviews Disease Primers* (2022). Sous licence CC BY 4.0. (Falanga et al., 2022).

La notion de plaie complexe apporte un angle complémentaire à cette classification. Ces lésions présentant un risque élevé de retard de guérison ou de non-fermeture, car elles sont influencées par des facteurs multiples qui altèrent la progression du processus cicatriciel. Ces plaies sont souvent désignées comme *hard-to-heal*, *non-healing* ou *stalled wounds*, en raison de leur incapacité à évoluer spontanément vers la résolution. Elles sont fréquemment associées à des conditions telles que les ulcères veineux, les ulcères du pied diabétique ou les escarres, et concernent particulièrement des patients présentant des comorbidités ou une fragilité physiologique. Les facteurs qui contribuent au caractère complexe de ces plaies peuvent être

locaux, comme l'infection, une perfusion insuffisante ou une atteinte importante des tissus, ou systémiques, incluant notamment le diabète, les troubles vasculaires ou l'âge avancé.

Tableau 2.1 Synthèse des facteurs liés au retard de guérison des plaies complexes, adaptée de Marques et al. (2023).

Type de plaies	Facteurs prédictifs de guérison retardée
Escarre / lésion de pression	Pas de facteur spécifique pour ce type de plaies
Ulcère veineux de jambe	• Plaie présente depuis plus de six mois • Surface ulcérée dépassant 5 cm² • Ulcère situé plutôt sur la jambe que sur la cheville • Historique d'ulcère antérieur prolongé • Progression initiale lente en termes de réduction horizontale ou verticale de la plaie
Ischémie chronique menaçant le membre	• Ulcère classé à un stade avancé dans le système WiFi • Présence d'infection locale • Lésion cataloguée au grade 3 dans la classification de l'Université du Texas • Catégorisation Rutherford niveau 6 • Présence de gangrène • Déficit tissulaire important

	• Plaie localisée sur la face dorsale du pied • Évolution de la lésion depuis plus de deux mois
Ulcère du pied diabétique	• Ulcère classé à un stade sévère selon le système WiFi • Classification de l'Université du Texas aux grades 2 ou 3 • Plaie de grande taille ($> 3 \text{ cm}^2$ ou $> 5 \text{ cm}^2$ selon les critères utilisés) • Intervalle prolongé entre l'apparition de la plaie et la première évaluation clinique • Infection documentée • Antécédents d'ulcères diabétiques • Stade ≥ 3 selon la classification de Wagner • Orientation tardive vers un spécialiste • Présence d'ulcères persistants ou récurrents • Réduction de la surface de la plaie $< 41,8 \%$ au bout de 4 semaines • Absence de modification du lit de la plaie durant la première semaine (selon imagerie thermique) • Ulcère profond

	• Localisation au médio-pied ou à l'arrière-pied • Nécessité d'un pansement antimicrobien• Gangrène associée • Macération du site ulcéré
--	--

2.3 Les approches thérapeutiques existantes

2.3.1 Traitements classiques

Historiquement, la prise en charge des plaies, qu'elles soient aiguës ou chroniques, repose sur des approches dites classiques, visant à maintenir un environnement propice à la cicatrisation tout en réduisant le risque infectieux. Ces méthodes incluent principalement les pansements, les produits topiques, les greffes cutanées, ainsi que des interventions chirurgicales spécifiques.

Les pansements constituent le pilier de la prise en charge locale des plaies. Leur objectif est double : protéger la plaie contre les agressions extérieures (microorganismes, déshydratation, traumatismes mécaniques) et maintenir un milieu humide contrôlé, reconnu depuis les travaux de Winter comme favorable à la migration des kératinocytes et à l'angiogenèse. Il existe plusieurs types de pansements : les pansements simples (gaze stérile, compresses), les pansements hydrocolloïdes, hydrogels, alginates, mousses de polyuréthane, pansements à base d'argent ou de miel, chacun ayant des propriétés spécifiques de rétention, d'absorption ou d'activité antimicrobienne.

Dans le contexte des plaies chroniques, ces pansements sont souvent associés à des agents topiques destinés à moduler la réponse inflammatoire, stimuler la prolifération cellulaire, ou contrôler la charge microbienne. Par exemple, des agents antimicrobiens (iode, argent, polyhexanide) sont intégrés à certains pansements pour limiter les infections locales et les biofilms. Le recours à des

enzymes débridantes (collagénase, papaïne) permet également d'éliminer les tissus nécrotiques sans chirurgie (Kolimi et al., 2022; Tottoli et al., 2020).

Les greffes de peau, qu'elles soient autologues, allogéniques ou xénogéniques, sont indiquées en cas de défaut de cicatrisation sur de grandes surfaces (brûlures étendues, ulcères réfractaires). Les greffes autologues, considérées comme la référence, nécessitent toutefois un site donneur sain, ce qui n'est pas toujours possible chez les patients polytraumatisés ou âgés. Des produits alternatifs comme les substituts dermiques acellulaires (ex. Integra®, Matriderm®) ou les dermo-épidermes bioingéniérés (ex. Apligraf®, Dermagraft®) ont été développés, mais leur coût élevé et leur accessibilité limitée restreignent leur utilisation à des contextes spécialisés (Kolimi et al., 2022; Mamun et al., 2024).

Parallèlement, des dispositifs comme la pression négative (VAC Therapy) sont utilisés pour favoriser la formation du tissu de granulation et drainer les exsudats, notamment dans les plaies chirurgicales complexes ou post-traumatiques (Mamun et al., 2024).

Enfin, dans les cas d'ulcères chroniques associés à une pathologie systémique (diabète, insuffisance veineuse ou artérielle), un traitement étiologique doit impérativement être associé : contrôle glycémique, correction d'un trouble vasculaire, compression veineuse, ou encore revascularisation chirurgicale (Tottoli et al., 2020).

2.3.2 Limites cliniques et scientifiques des traitements conventionnels

Malgré l'arsenal thérapeutique à disposition, les traitements classiques présentent de nombreuses limites, tant sur le plan clinique que scientifique. Ces approches restent palliatives et symptomatiques, sans résoudre les causes profondes du retard de cicatrisation, particulièrement dans les plaies chroniques.

Tout d'abord, une limite majeure est l'inefficacité face aux biofilms microbiens. Les pansements classiques ou antiseptiques topiques peinent à désorganiser les biofilms établis, qui protègent les agents pathogènes des défenses immunitaires et des antibiotiques. Cette résistance structurelle contribue à la chronicité et à la récurrence des plaies, notamment chez les patients diabétiques. Les biofilms fongiques (ex. *Candida albicans*) participent également à la persistance de l'inflammation

et à l'altération de la MEC, sans être ciblés efficacement par les traitements classiques (Ge & Wang, 2023; Miron et al., 2023).

Ensuite, plusieurs pansements modernes souffrent d'un manque de standardisation scientifique, avec des résultats inégaux selon les études. Peu d'entre eux sont évalués par des essais cliniques randomisés à grande échelle. L'hétérogénéité des modèles expérimentaux (type de plaie, pathologie sous-jacente, type de pansement, durée d'application) rend difficile une méta-analyse fiable sur leur efficacité réelle.

De plus, ces traitements ne permettent ni la régénération tissulaire fonctionnelle, ni la restauration de l'architecture native de la peau. Les greffes et substituts cutanés induisent souvent une réépithélialisation sans annexe (glandes, follicules), avec une résistance mécanique, une pigmentation ou une sensibilité réduite. Le tissu cicatriciel formé est souvent rigide, fibreux, et plus vulnérable aux agressions ultérieures (Kolimi et al., 2022)

Enfin, le coût élevé de certains produits de bioingénierie (greffons allogéniques, matrices bioactives) ou dispositifs (VAC®, pansements argentés) représente un frein majeur à leur généralisation, notamment dans les systèmes de santé publics ou les pays à ressources limitées. À cela s'ajoutent des contraintes logistiques (conservation, personnel formé) qui limitent leur usage en soins à domicile ou en ambulatoire (Kolimi et al., 2022).

Face à ces limites, les avancées récentes en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative apparaissent comme des solutions prometteuses. L'intégration de biomatériaux intelligents, de cellules autologues et de vecteurs bioactifs vise à dépasser les limites des traitements actuels en stimulant les voies endogènes de régénération cutanée.

2.4 L'ingénierie tissulaire appliquée à la peau

2.4.1 Principes de l'ingénierie tissulaire cutanée

L'ingénierie tissulaire appliquée à la peau repose sur l'association de trois éléments clés : un échaffaudage, des cellules fonctionnelles (kératinocytes, fibroblastes, ou cellules souches mésenchymateuses) et des signaux bioactifs. Cette approche vise à restaurer l'architecture et la fonction de la peau en reproduisant son microenvironnement naturel. L'échaffaudage sert à la fois

de support physique et de régulateur biochimique, en imitant les propriétés de la matrice extracellulaire (MEC). Il doit permettre l'adhérence, la migration et la prolifération des cellules, tout en étant biodégradable et permissif à l'échange de nutriments (Sarkar et al., 2013).

La peau possède une structure bilamellaire : un épiderme composé principalement de kératinocytes et un derme riche en fibroblastes. Pour reproduire cette organisation, les substituts cutanés sont souvent conçus avec une couche dense en surface pour accueillir les kératinocytes et une couche poreuse en profondeur pour favoriser la colonisation par les fibroblastes (Monteiro et al., 2015). Cette compartimentation favorise non seulement la structuration du tissu, mais aussi la communication cellule-cellule et cellule-matrice.

Certaines études ont montré que des structures poreuses en entonnoir ou hiérarchisées améliorent la distribution cellulaire, la production de matrice extracellulaire et la vascularisation, contribuant à une régénération cutanée plus efficace (Lu et al., 2012).

Ainsi, l'ingénierie tissulaire de la peau vise à reconstituer un tissu vivant et fonctionnel en orchestrant intelligemment les interactions entre les cellules, leur support biomatériel et les facteurs biologiques environnants.

2.4.2 Biomatériaux utilisés en cicatrisation

La régénération de la peau après une lésion repose non seulement sur les cellules impliquées, mais aussi sur les matériaux utilisés pour recréer un environnement favorable à la réparation tissulaire. Plusieurs biomatériaux ont ainsi été développés et testés dans des modèles précliniques, tant pour leurs propriétés mécaniques que pour leurs effets biologiques.

Le chitosane, dérivé de la chitine, est l'un des matériaux les plus étudiés en raison de ses capacités à soutenir les différentes étapes de la cicatrisation. En plus d'assurer une protection antimicrobienne, il favorise la formation du tissu de granulation et stimule l'angiogenèse. Des formulations enrichies en chitosane ont démontré une réduction de l'inflammation, notamment par l'activation des macrophages de type M2, et une amélioration de la réépithélialisation et de la production de collagène dans divers modèles de plaies cutanées (Y. Kim et al., 2023).

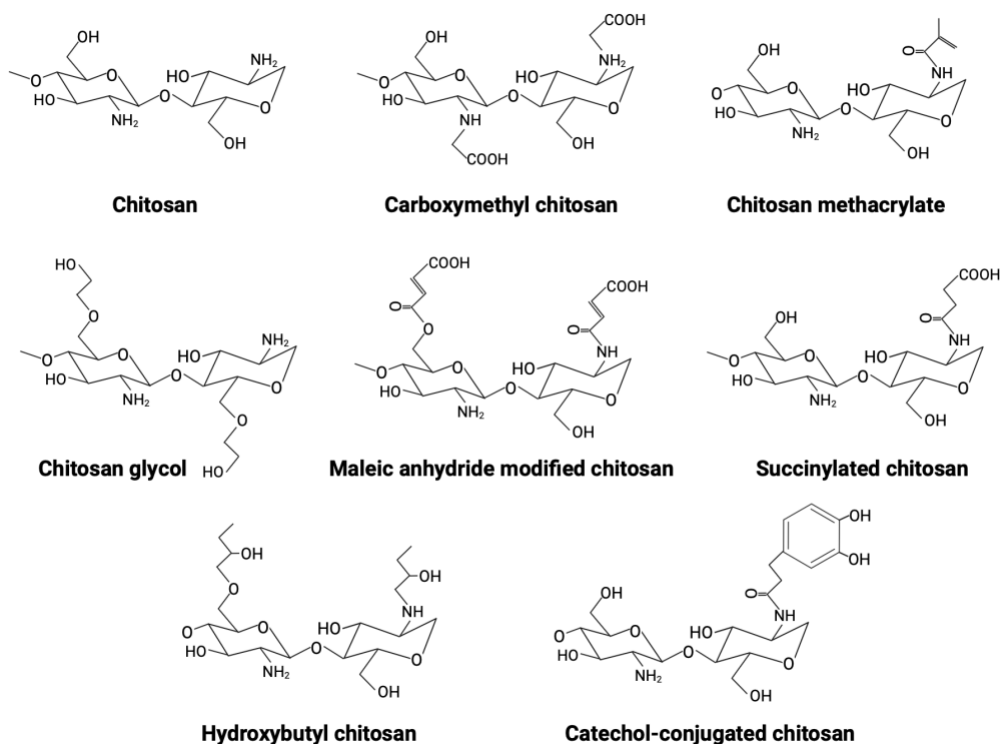


Figure 2.6 Représentation schématique de différentes formes chimiques de chitosane. Créé par Biorender.com.

D'autres approches s'appuient sur des échaffaudages hybrides, combinant un maillage synthétique en PLLA (acide poly-L-lactique) à des composants biologiques tels que le collagène ou la gélatine. Ces structures, conçues selon une architecture en entonnoir, permettent une répartition homogène des cellules et assurent une bonne intégration tissulaire. Elles ont montré leur capacité à soutenir la formation simultanée d'un derme et d'un épiderme organisés, tout en limitant la contraction de la plaie lors de la phase de remodelage (Lu et al., 2012).

L'acide hyaluronique, déjà utilisé pour ses propriétés hydratantes, peut être transformé en échaffaudages bioactifs capables d'accueillir des cellules cutanées (figure 2.7). Des modèles utilisant une technique de dépôt multicouche sur une base poreuse ont permis d'associer efficacement des fibroblastes et des kératinocytes dans une architecture reproduisant l'organisation naturelle de la peau. Ce type de co-culture a démontré une amélioration de la prolifération cellulaire et de la stratification épithéliale, ouvrant la voie à des substituts dermo-épidermiques plus performants (Monteiro et al., 2015).

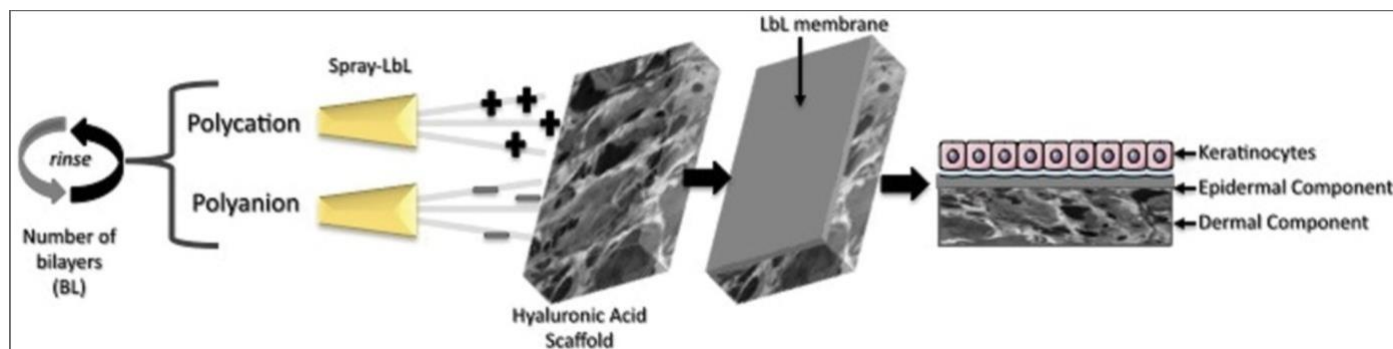


Figure 2.7 Représentation schématique de la stratégie utilisée pour générer une construction épidermique–dermique. Le polycation (poly-L-lysine) et le polyanion (acide hyaluronique) sont appliqués par pulvérisation sur un échafaudage poreux d’acide hyaluronique, formant une membrane en couches successives (layer-by-layer). Cette membrane joue le rôle de composant épidermique, tandis que l’échafaudage poreux sous-jacent constitue le composant dermique. Des kératinocytes sont ensuite déposés sur la membrane pour établir un monocouche cellulaire. Reproduit avec permission de Wiley. Licence n° 6153770844249 (Monteiro et al., 2015).

Enfin, l’intégration de cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ADSC) dans ces matrices permet d’amplifier la régénération. Ces cellules exercent une action paracrine bénéfique : elles modulent la réponse inflammatoire, stimulent l’angiogenèse et participent au remodelage de la matrice extracellulaire. Leur effet sur la réduction de l’inflammation chronique est particulièrement pertinent dans les plaies complexes ou non cicatrisantes (Marfia et al., 2015) .

Ces résultats montrent que la combinaison intelligente de matériaux naturels ou synthétiques avec des éléments cellulaires ou bioactifs constitue aujourd’hui l’un des axes les plus prometteurs pour le développement de substituts cutanés efficaces.

2.4.3 Intégration de cellules autologues dans les implants

L’intégration de cellules autologues dans les substituts cutanés représente une approche de plus en plus privilégiée en ingénierie tissulaire, car elle permet d’associer soutien structurel et stimulation biologique intrinsèque. En s’appuyant sur les cellules du patient lui-même, cette stratégie vise à

favoriser une régénération tissulaire harmonieuse, tout en limitant les risques immunologiques et les complications associées aux matériaux allogéniques ou xénogéniques.

Les cellules les plus couramment utilisées sont les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (ADSC), du derme ou de la moelle osseuse. Parmi celles-ci, les ADSC ont attiré une attention particulière en raison de leur accessibilité, de leur capacité à se différencier en cellules cutanées (fibroblastes, kératinocytes) et de leur puissante activité paracrine. Lorsqu'elles sont intégrées dans des échafaudages biomatériaux, ces cellules libèrent un ensemble de facteurs bioactifs (tels que VEGF, TGF- β , HGF, IL-10) qui modulent positivement la réponse inflammatoire, favorisent l'angiogenèse et stimulent le remodelage de la matrice extracellulaire (Konno et al., 2013; Marfia et al., 2015).

Mesenchymal Stem Cell Differentiation

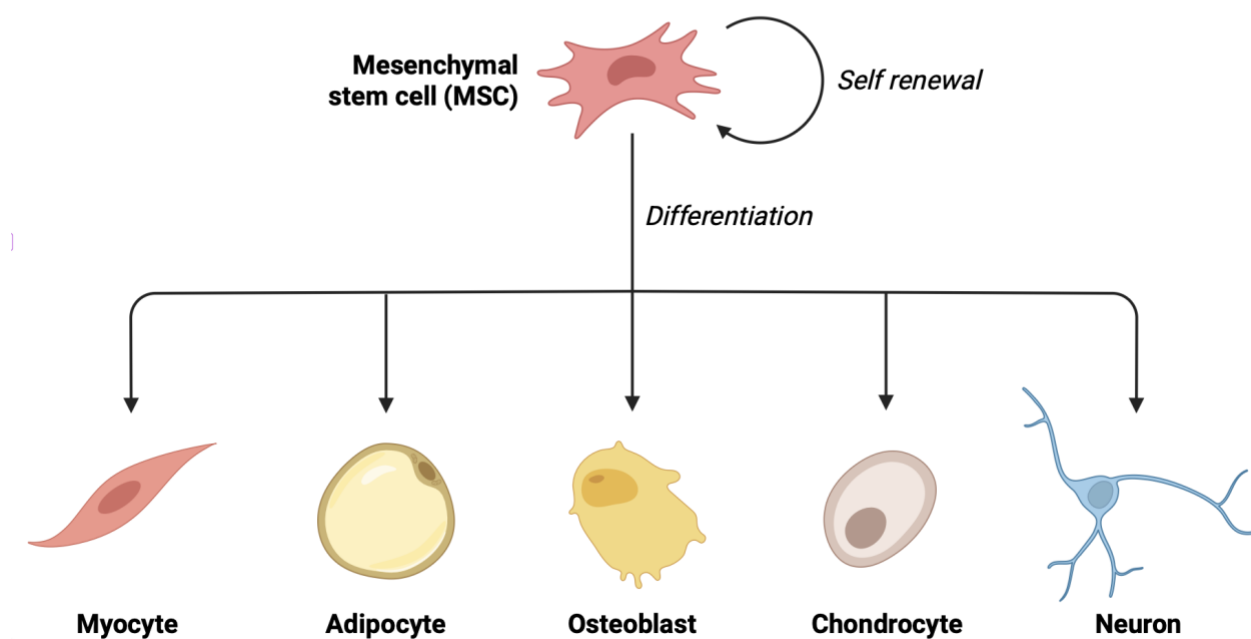


Figure 2.8 Représentation schématique du potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC). *Illustration réalisée avec BioRender.com.*

Plusieurs études ont montré que les implants enrichis en cellules autologues induisent une meilleure réépithélialisation, une densité dermique accrue, une vascularisation plus rapide et une réduction des infiltrats inflammatoires. Ces effets sont particulièrement bénéfiques dans le contexte des plaies chroniques, où la cicatrisation est souvent bloquée dans une phase inflammatoire persistante. Dans ces situations, l'apport local de cellules capables de rééquilibrer l'environnement biologique semble capable de relancer efficacement le processus de guérison (Marfia et al., 2015).

L'utilisation de cellules autologues en contexte chirurgical nécessite cependant une standardisation rigoureuse des étapes d'isolement, de préparation et d'application. Des techniques comme le ReCell® ou les microgreffes autologes en spray illustrent bien le potentiel d'application clinique directe de ces approches. Toutefois, des limites persistent quant à la viabilité cellulaire après transplantation, la répartition homogène sur la plaie, et la capacité des cellules à persister dans le tissu régénéré à long terme (Holmes et al., 2019).

Dans l'ensemble, l'intégration de cellules autologues dans les implants représente une avancée significative vers des solutions de cicatrisation personnalisées, combinant compatibilité biologique, stimulation de la régénération et potentiel de transposition clinique. Son efficacité dépend toutefois du choix du biomatériau porteur, de l'environnement tissulaire, et de la qualité des cellules isolées.

2.5 Le chitosane comme biomatériau prometteur

2.5.1 Origine, propriétés physico-chimiques et biologiques

Le chitosane est un polysaccharide obtenu par déacétylation partielle de la chitine, un composant majeur des exosquelettes de crustacés, des insectes et des parois cellulaires de champignons. Sa structure linéaire repose sur des unités de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine, reliées par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$, ce qui lui confère une certaine similitude avec la cellulose, tout en offrant des groupes amines réactifs permettant de nombreuses modifications fonctionnelles (Levengood & Zhang, 2014).

Sur le plan physico-chimique, le chitosane présente une excellente solubilité dans les milieux acides, en raison de la protonation de ses groupes amines primaires, ce qui en fait un polymère cationique unique. Son poids moléculaire et son degré de déacétylation influencent directement sa

solubilité, sa cristallinité, sa viscosité, ainsi que ses propriétés biologiques comme l'adhésion cellulaire, la biodégradabilité et la bioactivité. Il peut être transformé en diverses formes telles que films, éponges, hydrogels ou fibres, qui sont largement utilisées en ingénierie tissulaire pour moduler la libération de substances bioactives et favoriser l'intégration tissulaire (Y. Kim et al., 2023; Levengood & Zhang, 2014).

Biologiquement, le chitosane est reconnu pour sa biocompatibilité, sa faible immunogénicité et sa capacité à favoriser l'hémostase, la prolifération cellulaire et la revascularisation. Il agit comme une matrice tridimensionnelle favorable à la migration et à la prolifération des fibroblastes et kératinocytes, et stimule la formation de collagène de type I et III, renforçant ainsi la solidité du tissu cicatriciel. De plus, ses propriétés antimicrobiennes, largement dépendantes de sa charge cationique, contribuent à réduire le risque d'infection sur le site de la plaie (Akhtari et al., 2024).

Enfin, le chitosane possède également un potentiel immunomodulateur important : il est capable d'influencer la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 pro-régénératif, de moduler la sécrétion de cytokines comme l'IL-1 β , le TGF- β ou le PDGF, et de favoriser un environnement propice à la réparation tissulaire (figure 2.9). Ces propriétés font du chitosane un biomatériau de choix pour la conception de pansements intelligents et d'implants dermiques dans le traitement des plaies chroniques ou complexes (Akhtari et al., 2024; Y. Kim et al., 2023).

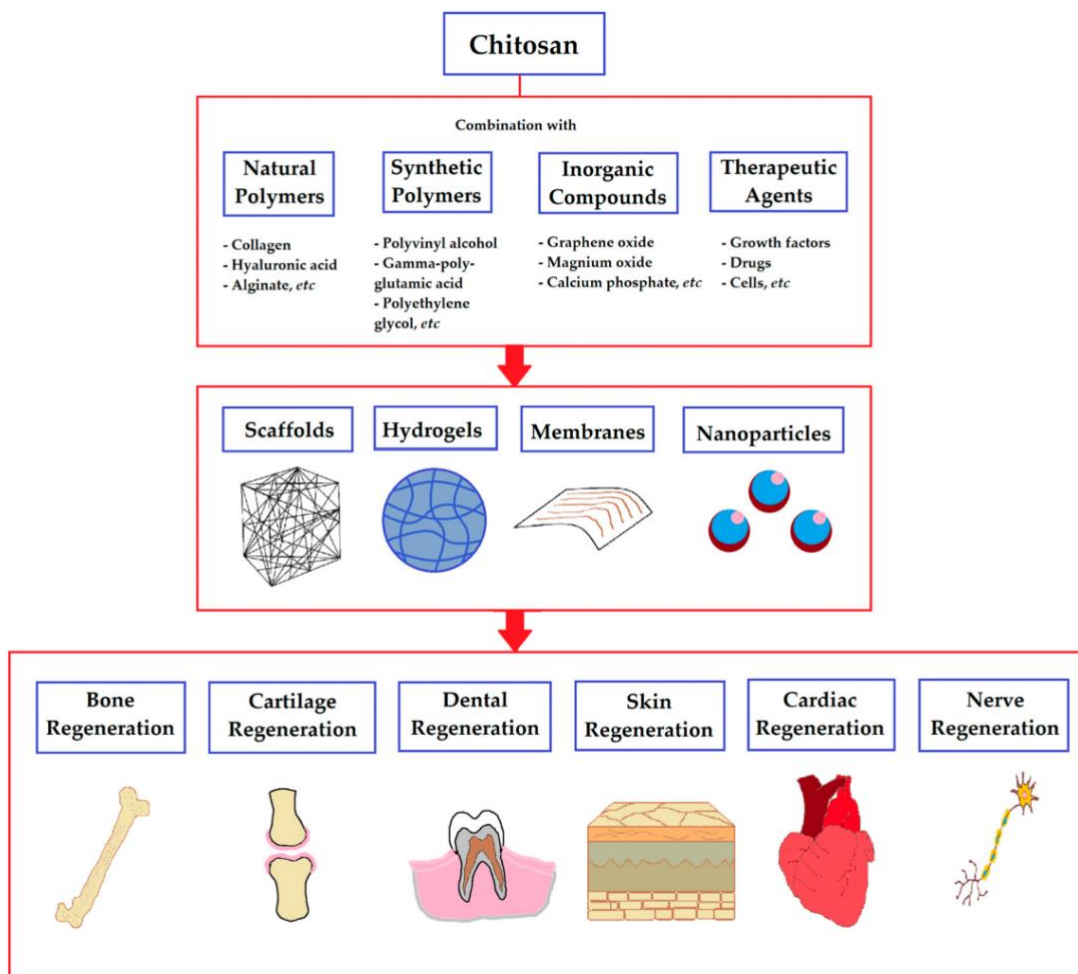


Figure 2.9 Utilisation des biomatériaux à base de chitosane pour la régénération tissulaire. Le chitosane peut être formulé seul ou en combinaison avec des polymères naturels ou synthétiques, des composés inorganiques et des agents thérapeutiques, sous diverses formes telles que des échafaudages, des hydrogels, des membranes et des nanoparticules. Ces biomatériaux ont démontré leur capacité à favoriser la régénération et la réparation de différents tissus, notamment osseux, cartilagineux, dentaires, cutanés, cardiaques et nerveux. Reproduit à partir de Kim Y. et al., *Pharmaceutics* (2023). Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). (Y. Kim et al., 2023).

2.5.2 Rôles du chitosane dans la cicatrisation cutanée

Le chitosane intervient à différents niveaux du processus cicatriciel, en influençant chacune des grandes phases de la régénération cutanée : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire.

Dès la phase d'hémostase, il contribue à limiter le saignement en favorisant l'agrégation des plaquettes et des globules rouges sur le site lésionnel, et en réduisant la dilution de la fibrine, ce qui facilite la formation du caillot sanguin. En parallèle, ses propriétés antimicrobiennes naturelles réduisent le risque de colonisation bactérienne, un facteur critique dans les plaies à risque infectieux (Y. Kim et al., 2023) (Akhtari et al., 2024).

Sur le plan immunitaire, le chitosane est capable de réguler l'inflammation par le biais de différents mécanismes. Il module la production de cytokines pro-inflammatoires telles que $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$, tout en activant des voies de signalisation telles que $\text{PI3K/AKT/mTOR/HIF-1}\alpha/\text{VEGFA}$, contribuant ainsi à atténuer la réponse inflammatoire aiguë. Ce polymère favorise également la polarisation des macrophages vers le phénotype M2, reconnu pour ses fonctions anti-inflammatoires et réparatrices. Cette capacité est encore renforcée par certaines modifications structurales comme la sulfatation, qui augmente significativement la proportion de macrophages M2 activés au site de la plaie.

Au stade prolifératif, le chitosane stimule fortement la migration et la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes, ainsi que l'angiogenèse, ce qui se traduit par une accélération de la réépithélialisation et un renforcement du tissu néoformé. Il induit également une augmentation de la production de collagènes de types I et III, essentiels à la résistance mécanique du derme réparé. Utilisé sous forme de membranes ou d'hydrogels, le chitosane agit comme une matrice extracellulaire biomimétique qui soutient l'activité métabolique des cellules et la synthèse de nouveaux composants matriciels (Akhtari et al., 2024) (Y. Kim et al., 2023).

Grâce à cette action multifactorielle, le chitosane ne se limite pas à un simple rôle de support passif, mais agit comme un acteur bioactif de la cicatrisation, en modulant l'environnement cellulaire et en soutenant les mécanismes de réparation tissulaire de manière ciblée et efficace.

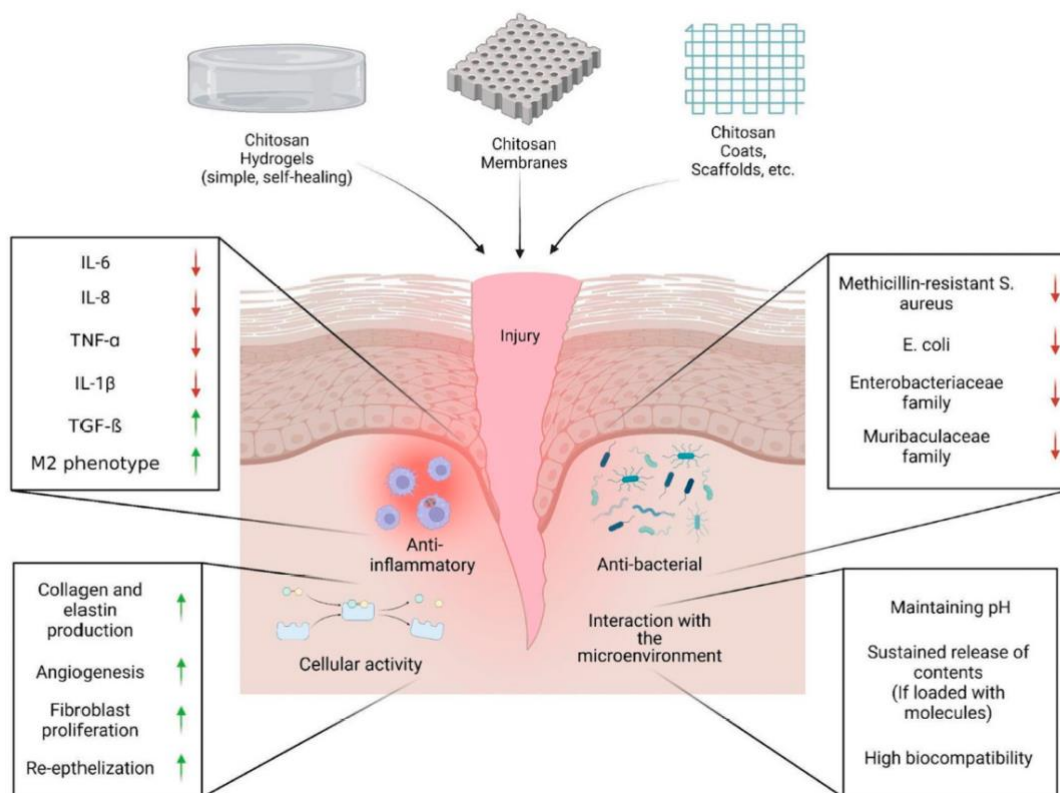


Figure 2.10 Effet de l'application de différentes formes de biomatériaux à base de chitosane sur les lésions cutanées. Diverses formulations de matériaux à base de chitosane sont étudiées pour le traitement des plaies cutanées, notamment les hydrogels, les membranes, les gels topiques, les éponges, entre autres. En raison des propriétés physico-chimiques du chitosane, ces biomatériaux agissent à toutes les étapes du processus de cicatrisation, en favorisant la réparation cutanée, en réduisant la fibrose et en exerçant des effets anti-inflammatoires, antibactériens et pro-prolifératifs. Reproduit à partir de Kim Y. et al., *Pharmaceutics* (2023). Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). (Y. Kim et al., 2023).

2.5.3 Limites du chitosane seul et besoins d'optimisation

Malgré ses nombreux atouts, le chitosane utilisé seul en cicatrisation présente plusieurs limitations qui restreignent son efficacité clinique. En premier lieu, sa solubilité dépend fortement du pH et de son degré de déacétylation. En milieu neutre ou basique, sa capacité à se dissoudre diminue fortement, ce qui limite sa transformation en formulations injectables ou son usage dans des environnements physiologiques classiques. Cette propriété entrave également sa diffusion homogène dans les tissus et sa biodisponibilité locale (Aranaz et al., 2021).

De plus, bien que le chitosane offre une structure tridimensionnelle favorable à la migration cellulaire, il ne possède pas toujours les signaux bioactifs nécessaires pour déclencher une régénération tissulaire complète. Son action reste majoritairement passive, en servant de support mécanique plutôt que de stimulateur biologique actif. Plusieurs études ont rapporté que l'application du chitosane seul entraîne souvent une réépithélialisation partielle et une organisation dermique incomplète, surtout dans les plaies chroniques ou sévèrement inflammatoires (Aranaz et al., 2021; Wang, 2022).

Par ailleurs, la structure chimique du chitosane peut être hétérogène d'un lot à l'autre selon son origine (crustacés, insectes, champignons) et les conditions de déacétylation, ce qui compromet la reproductibilité de ses effets thérapeutiques. Le chitosane est un polymère biodégradable dont la dégradation dépend principalement de son degré de déacétylation (DD). Selon les données expérimentales rapportées, sa dégradation se fait essentiellement par l'action de la lysozyme, une enzyme naturellement présente dans les fluides corporels. Les expériences montrent que la vitesse de biodégradation augmente de manière marquée lorsque le DD diminue. Les matrices présentant un DD faible (par exemple 52,6 %, 56,1 % ou 62,4 %) subissent une perte de poids rapide, avec des demi-vies de dégradation respectives d'environ 9,8 jours, 27,3 jours et plus de 56 jours. À l'inverse, des matrices ayant un DD élevé (71,7 %, 81,7 % et 93,5 %) conservent plus de 85 % de leur poids après 84 jours, indiquant une dégradation nettement plus lente. Cette relation entre DD, absorption d'eau, gonflement et perte de masse met en évidence que la biodégradabilité du chitosane peut être modulée en ajustant son degré d'acétylation, permettant ainsi d'obtenir des durées de dégradation allant de quelques jours à plusieurs mois (Ren et al., 2005).

L'association du chitosane à des agents biologiquement actifs (comme des cellules autologues, des protéines plasmatiques ou des facteurs de croissance) permettrait d'amplifier son potentiel thérapeutique tout en compensant ses insuffisances intrinsèques. Ces formulations hybrides apparaissent aujourd'hui comme une voie prometteuse pour dépasser les limites du chitosane seul dans le domaine de l'ingénierie tissulaire cutanée (Aranaz et al., 2021; Y. Kim et al., 2023).

2.6 Thrombine

La thrombine est une sérine-protéase principalement reconnue pour son rôle clé dans l'hémostase, où elle transforme le fibrinogène en fibrine pour stabiliser le caillot sanguin (Gugerell et al., 2014). Toutefois la littérature montre que ses fonctions dépassent largement le domaine de la coagulation.

Dans les phases précoces de la réparation tissulaire, la thrombine exerce une action notable sur la réponse inflammatoire. Elle recrute les neutrophiles et macrophages vers la zone lésée et active différentes cellules, notamment endothéliales et musculaires lisses, via l'activation du récepteur PAR-1 (Gugerell et al., 2014). Cette signalisation contribue à augmenter la perméabilité vasculaire et à renforcer l'arrivée des cellules immunitaires nécessaires au nettoyage de la plaie.

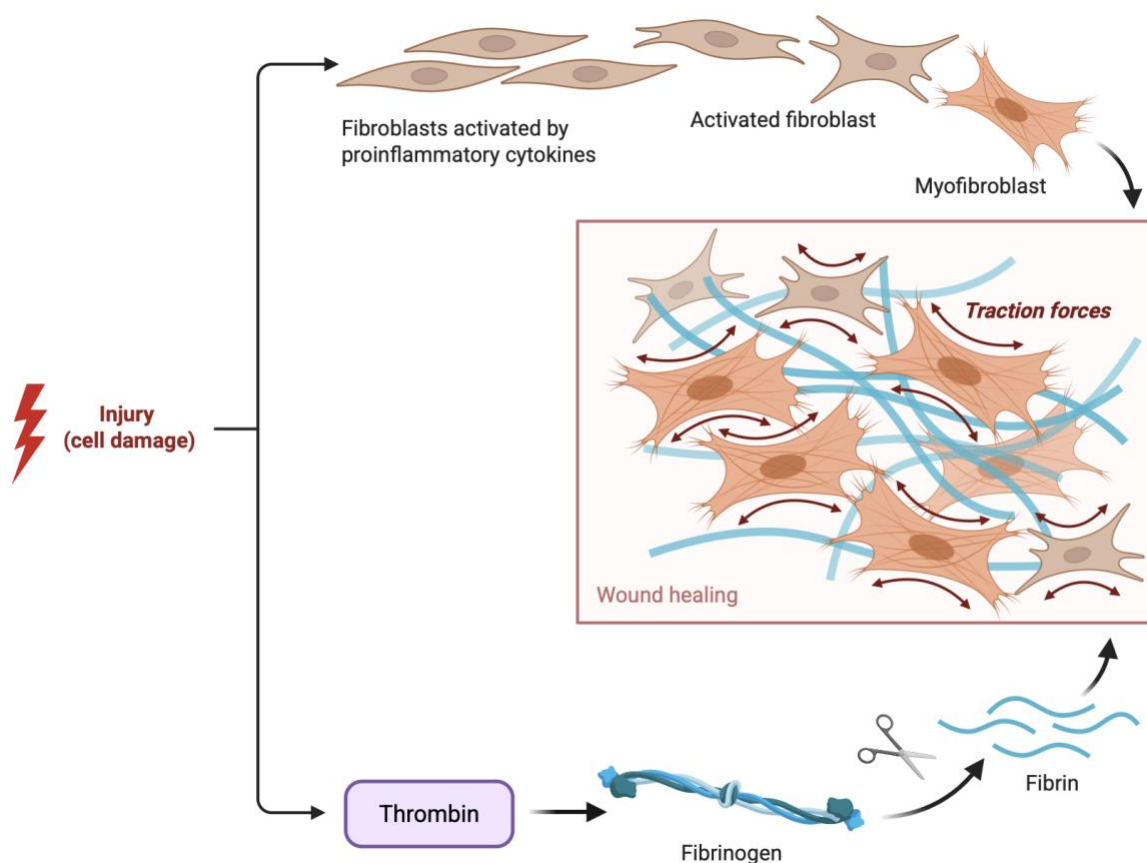


Figure 2.11 Illustration schématique du rôle de la thrombine dans la cicatrisation cutanée. À la suite d'une lésion tissulaire, les fibroblastes sont activés par les cytokines pro-inflammatoires, puis se transforment progressivement en myofibroblastes. En parallèle, la thrombine générée au site de la

lésion clive le fibrinogène, conduisant à la formation d'un réseau de fibrine qui stabilise le caillot et sert de matrice provisoire pour la réparation tissulaire. Schéma réalisé avec BioRender.com.

La thrombine influence également la dynamique du tissu conjonctif. Elle stimule directement les fibroblastes, augmentant la transcription du procollagène et la synthèse du collagène, deux mécanismes essentiels à la formation de la matrice extracellulaire dans les premières étapes de la cicatrisation(Chambers et al., 1998). Cette stimulation fibroblastique participe à la constitution d'un tissu de granulation plus dense et mieux organisé.

Son impact s'étend aussi à la néovascularisation. Des travaux ont montré que des cellules stromales mésenchymateuses "primées" avec de la thrombine libèrent davantage de vésicules extracellulaires contenant des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF et angiogénine, augmentant ainsi la prolifération, la migration et l'assemblage des cellules endothéliales(Sung et al., 2019). Cette modulation renforce la formation de nouveaux vaisseaux, un élément essentiel pour l'apport en nutriments et en oxygène au tissu en réparation.

Sur le plan macroscopique, plusieurs études animales ont montré que l'application locale de thrombine accélère la fermeture des plaies cutanées. Les résultats rapportent une progression plus rapide de l'épithélialisation, une maturation plus harmonieuse du tissu de granulation et une amélioration globale du rythme de cicatrisation par rapport aux témoins(Stiernberg et al., 2000). L'ensemble de ces effets illustre le rôle central de la thrombine, agissant de façon coordonnée sur l'hémostase, l'inflammation, la production matricielle et l'angiogenèse.

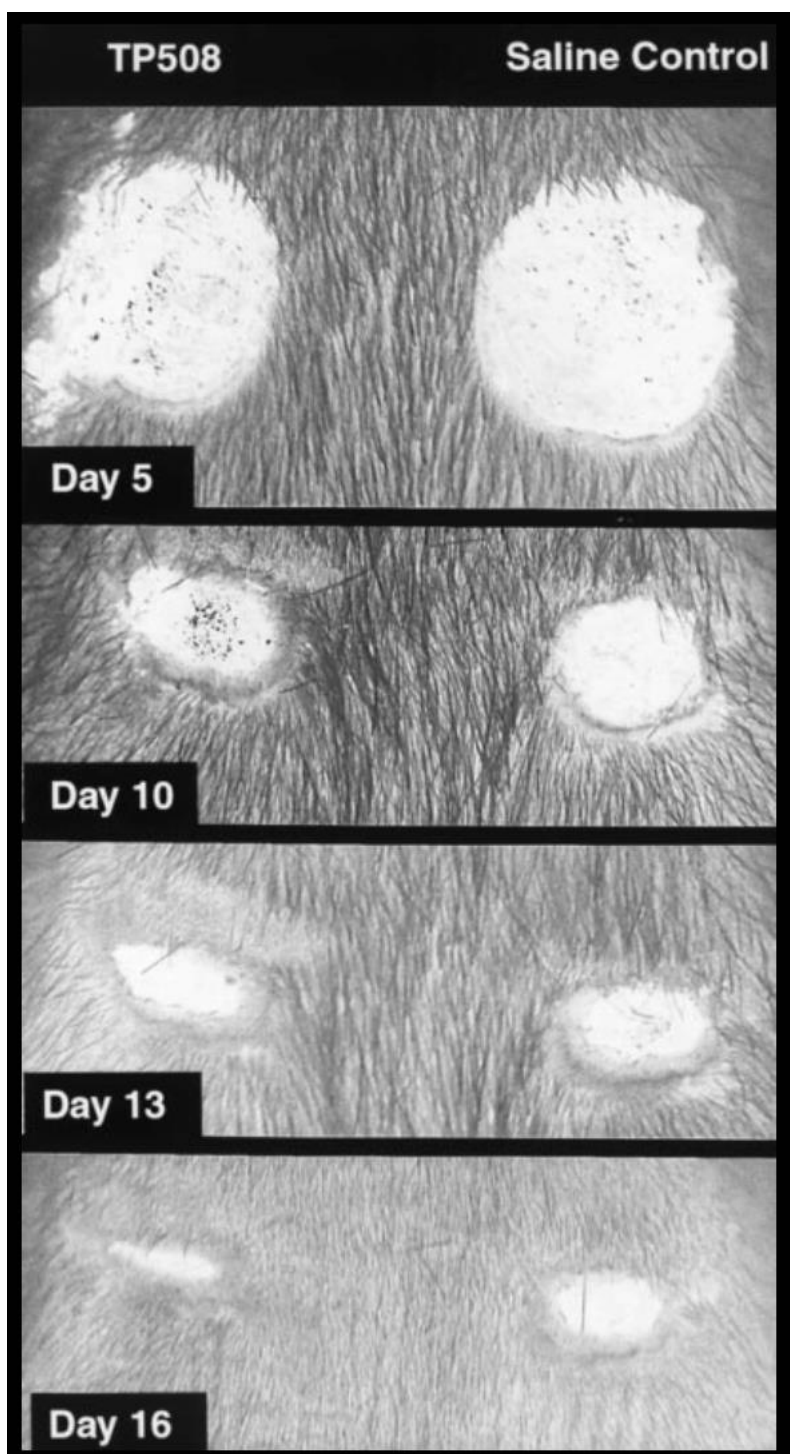


Figure 2.12 Effet du peptide thrombinique TP508 sur la fermeture de plaies cutanées pleine épaisseur chez le rat. Des excisions circulaires de 2 cm de diamètre ont été réalisées par paires sur le dos de rats, en traversant le pannicule charnu afin d'exposer le fascia et la couche musculaire sous-jacente. Chaque animal a reçu, sur un côté, une application topique unique de 40 μ L de solution saline (contrôle) et, sur l'autre côté, 40 μ L de solution contenant 0,4 μ g de TP508. Les mêmes animaux ont ensuite été anesthésiés légèrement et photographiés aux jours indiqués pour

suivre l'évolution de la fermeture des plaies. *Reproduit avec permission (Licence n° 6153800293118) à partir de Stiernberg et al., "Acceleration of full-thickness wound healing in normal rats by the synthetic thrombin peptide TP508", Wound Repair and Regeneration, 2000.*

2.7 Fibrinogène

Le fibrinogène est une glycoprotéine plasmatique essentielle au processus d'hémostase et à la mise en place de la matrice initiale de réparation. Il constitue le substrat direct de la thrombine, qui le clive pour générer de la fibrine, élément structural fondamental du caillot initial formé immédiatement après la lésion (Mogford et al., 2009). Cette fibrine insoluble organise l'arrêt du saignement et crée une architecture tridimensionnelle indispensable au déroulement des premières phases de cicatrisation.

Une fois formée, la matrice de fibrine joue un rôle déterminant dans la phase inflammatoire et dans le développement du tissu de granulation. Cette matrice constitue une matrice provisoire infiltrée par les macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales, qui la dégradent progressivement tout en reconstruisant le tissu lésé. Cette structure stabilise la plaie, soutient la migration cellulaire et sert de support à la prolifération des fibroblastes dans un environnement tridimensionnel, facilitant ainsi l'établissement du tissu de granulation.

Le rôle du fibrinogène dépasse cependant la seule structuration mécanique de la matrice. Drew et al. (2001) a démontré que l'absence de ce composant perturbe directement l'organisation cellulaire au sein de la plaie : les cellules migrent de manière désordonnée, le tissu de granulation se forme de façon irrégulière et l'épithélialisation devient hyperplasique et anormale, bien que le temps global de guérison soit similaire aux animaux témoins. Ces observations démontrent que le fibrinogène contribue au guidage spatial des cellules réparatrices, garantissant une architecture cohérente du tissu en cours de reconstitution.

D'un point de vue mécanique, le fibrinogène est également indispensable à la stabilité initiale de la plaie. La résistance mécanique mesurée dans les premiers jours suivant la lésion est fortement réduite chez les animaux dépourvus de fibrinogène, rendant difficile la cohésion des berges de

plaie et compromettant la solidité du lit lésionnel. Cette fonction de soutien mécanique est donc essentielle pour maintenir un environnement propice à la réparation (Drew et al., 2001).

Enfin, plusieurs travaux montrent que le fibrinogène peut également servir de plateforme thérapeutique en régénération tissulaire. Mogford et al. (2009) ont démontré que les formulations de scellant fibrineux contenant du fibrinogène permettent d'inclure des fibroblastes et des facteurs de croissance tels que le PDGF-BB, augmentant ainsi la formation du tissu de granulation et améliorant la qualité de la réparation *in vivo*. La matrice issue du fibrinogène agit ainsi non seulement comme un support structurel, mais aussi comme un système de délivrance de cellules et de signaux bioactifs au sein de la plaie (Mogford et al., 2009).

2.8 Acide Gras

Il existe dans la littérature les acides gras insaturés, essentiels ou non essentiels, capables d'interagir avec plusieurs composantes cellulaires impliquées dans la cicatrisation cutanée. Les acides gras n-3 (linoléique), n-6 (linoléique) et n-9 (oléique) sont décrits comme des constituants majeurs des phospholipides membranaires, jouant un rôle fonctionnel dans la signalisation intracellulaire, la modulation de l'inflammation et la régulation des interactions cellulaires au sein du tissu cutané. Leur intégration dans les membranes, particulièrement celles des cellules inflammatoires, leur permet de modifier la réponse immune initiale qui succède à une lésion cutanée.

Dans le modèle expérimental de Cardoso et al., l'application topique d'acides gras influence directement la vitesse de fermeture des plaies. L'acide gras n-9 favorise une réduction plus rapide de la surface des plaies et s'accompagne d'une diminution marquée de la production locale de monoxyde d'azote (NO), suggérant un impact sur les médiateurs inflammatoires. À l'inverse, les acides gras n-3 retardent la fermeture des plaies tout en induisant une augmentation précoce du NO et une accumulation plus importante de matrice extracellulaire après quelques jours de traitement, illustrant leur influence sur les premières phases inflammatoires et sur la synthèse du tissu de granulation. Les acides gras n-6 produisent un effet intermédiaire : une amélioration modérée de la fermeture associée à un pic transitoire de NO au cours des premières 48 heures,

indiquant une modulation plus limitée mais néanmoins significative de l'inflammation locale(Ribeiro Barros Cardoso et al., 2004).

Zong et al. a étudié des extraits d'acides gras sous forme de sels sodiques (FASS) et démontré leur capacité à stimuler plusieurs comportements cellulaires essentiels à la cicatrisation, notamment la prolifération, la migration et la formation de structures vasculaires par des cellules endothéliales humaines (HUVECs). Les auteurs montrent que les FASS favorisent également la transition endothélio-mésenchymateuse, un processus impliqué dans la stabilisation des néovaisseaux durant l'angiogenèse. Sur le plan moléculaire, les acides gras activent plusieurs voies de signalisation pro-angiogéniques, incluant les cascades AKT, ERK et TGF- β /Smad3, tout en augmentant l'expression de facteurs tels que PDGF, TGF- β 1 et VEGFA, connus pour coordonner la prolifération cellulaire, l'organisation de la matrice extracellulaire et la formation de nouveaux vaisseaux. Dans un modèle de plaie aiguë chez le rat, ces acides gras accélèrent la cicatrisation et modulent l'expression de marqueurs liés à la survie cellulaire, renforçant leur rôle dans la régénération tissulaire cutanée(Zong et al., 2020).

Enfin, l'étude de Shingel et al. met en évidence l'intérêt de formulations à base d'émulsions solides pour délivrer efficacement des acides gras polyinsaturés dans un contexte de réparation cutanée, soulignant que ces composés peuvent contribuer à restaurer l'intégrité tissulaire grâce à leur implication dans des processus inflammatoires et immunitaires essentiels à la cicatrisation(Shingel et al., 2008).

2.9 Cellules autologues et régénération cutanée

2.9.1 Intérêt des kératinocytes et fibroblastes autologues

Les kératinocytes et les fibroblastes autologues jouent un rôle fondamental dans le processus de régénération cutanée. En tant que composants cellulaires majeurs de l'épiderme et du derme respectivement, ils collaborent étroitement via des signaux paracrines pour initier et soutenir la cicatrisation. Les fibroblastes assurent la production de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, laminine) et participent activement à l'organisation du tissu de granulation (figure 2.13),

tandis que les kératinocytes favorisent la réépithélialisation et restaurent la fonction barrière de la peau blessée (Tottoli et al., 2020).

Les interactions entre ces deux types cellulaires stimulent la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance clés tels que le VEGF, HGF, GM-CSF ou IL-8, qui favorisent non seulement la migration cellulaire, mais aussi l'angiogenèse et la prolifération cellulaire nécessaire à la réparation cutanée. Plusieurs travaux ont montré que l'application conjointe de fibroblastes et de kératinocytes sur des substituts dermiques permettait une fermeture plus rapide des plaies en comparaison aux cultures monocellulaires, soulignant la synergie bénéfique entre ces cellules dans les modèles de co-culture (Zuliani et al., 2013).

De plus, les approches utilisant des substituts cutanés cellulaires enrichis en kératinocytes et fibroblastes autologues ont démontré leur efficacité pour relancer la cicatrisation dans les plaies chroniques, en réduisant l'inflammation, en réorganisant la jonction dermo-épidermique et en renforçant l'épaisseur épithéliale (Konno et al., 2013).

Enfin, l'intérêt de ces cellules réside aussi dans leur tolérance immunologique (Zuliani et al., 2013), leur compatibilité avec le patient et leur potentiel à sécréter un environnement riche en signaux pro-régénératifs, ce qui justifie leur intégration dans des stratégies avancées de médecine régénérative ciblant les plaies complexes ou chroniques.

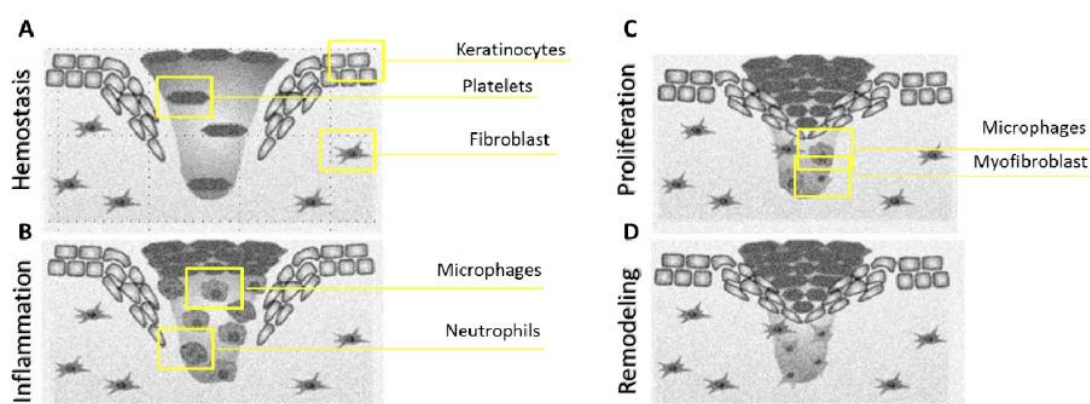


Figure 2.13 Représentation schématique du processus de cicatrisation cutanée et des cellules impliquées à chaque phase. Reproduit à partir de Tottoli E.M., Dorati R., Genta I., Chiesa E., Pisani S., Conti B., « Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration », *Pharmaceutics* (2020), 12(8) : 735. DOI:

10.3390/pharmaceutics12080735. Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). (Tottoli et al., 2020).

2.9.2 Méthodes d'isolement et viabilité

L'isolement des kératinocytes et des fibroblastes à partir de biopsies cutanées repose sur des méthodes bien établies combinant digestion enzymatique et culture *ex vivo*. En pratique, après prélèvement d'un fragment de peau, une dissociation mécanique est souvent suivie d'un traitement enzymatique, le plus souvent par la trypsine ou la collagenase, permettant de séparer les compartiments épidermique et dermique. Cette approche favorise la libération de kératinocytes depuis l'épiderme et de fibroblastes à partir du derme profond. Par exemple, une méthode efficace inclut l'utilisation de la trypsine pour décoller les fibroblastes, suivie d'un changement de milieu afin d'optimiser la prolifération des kératinocytes adhérents (Zuliani et al., 2013).

Des techniques alternatives, comme la méthode d'«outgrowth» (où les cellules migrent naturellement hors des explants dermo-épidermiques) sont également documentées. Cette stratégie permet d'éviter les dommages enzymatiques potentiels, en particulier pour les kératinocytes plus fragiles. Elle s'est avérée utile pour générer des cultures cliniquement exploitables à partir d'un seul échantillon cutané (Zuliani et al., 2013).

Sur le plan de la viabilité cellulaire, plusieurs études confirment que les fibroblastes humains isolés conservent une capacité d'adhésion, de prolifération et de sécrétion de matrice extracellulaire lorsqu'ils sont cultivés dans des milieux adaptés, enrichis en sérum fœtal bovin et antibiotiques. De même, les kératinocytes, une fois correctement isolés, forment rapidement un épithélium stratifié en culture, à condition d'être maintenus dans un environnement permissif et sur des supports biomimétiques favorisant leur différenciation progressive (Sarkar et al., 2013)(Monteiro et al., 2015).

La qualité et la fonctionnalité des cellules isolées sont également influencées par des facteurs tels que l'âge du donneur, le site de prélèvement, la durée entre prélèvement et mise en culture, ainsi que la présence de cellules nourricières dans le microenvironnement immédiat. Enfin, l'utilisation de supports 3D comme les hydrogels ou les matrices collagéniques peut améliorer la survie

cellulaire à long terme, limiter le stress oxydatif et reproduire plus fidèlement l'organisation du tissu cutané natif (Ojeh et al., 2015)(Monteiro et al., 2015).

2.9.3 Systèmes de livraison cellulaire : exemple de RECELL

Parmi les approches cliniques les plus avancées pour la transplantation autologue de cellules cutanées, le système RECELL® représente une technologie innovante de délivrance cellulaire au point d'intervention. Il permet d'obtenir, à partir d'une très petite biopsie de peau (environ 1 cm²), une suspension autologue de cellules cutanées (ASCS) capable de traiter jusqu'à 80 cm² de surface blessée. Cette suspension, composée de kératinocytes, de mélanocytes et de fibroblastes, est obtenue par une digestion enzymatique rapide sans étape de culture en laboratoire, ce qui la rend immédiatement disponible pour application clinique directe sur le lit de la plaie (Iv et al., 2018).

Utilisée seule ou en combinaison avec un greffon en filet (STSG), la solution cellulaire générée par RECELL favorise une régénération épidermique rapide et une réépithélialisation efficace, tout en réduisant significativement la taille et la morbidité des sites donneurs. Plusieurs essais cliniques randomisés ont démontré que le recours à RECELL est associé à une réduction notable de la douleur, une guérison accélérée des sites donneurs, et une satisfaction accrue des patients par rapport aux techniques conventionnelles de greffe (Holmes et al., 2019).

Contrairement aux autogreffes classiques nécessitant des surfaces importantes de peau saine, le dispositif RECELL minimise les prélèvements tout en assurant des résultats comparables en termes de fermeture définitive des plaies. Cette stratégie est particulièrement précieuse dans les cas de brûlures profondes ou étendues, où la disponibilité de tissu donneur est limitée. En facilitant une intervention précoce, RECELL permet également de prévenir les complications telles que les infections, les douleurs prolongées, et la formation de cicatrices hypertrophiques, tout en réduisant la durée d'hospitalisation (Iv et al., 2018).

Les limites du système RECELL apparaissent clairement dans les résultats cliniques rapportés. Bien que la technique permette de réduire la surface du site donneur, elle n'offre aucune amélioration significative de la vitesse de guérison, de la douleur postopératoire ou de la qualité cicatricielle par rapport à une greffe cutanée standard, les taux de fermeture, de complications et de perte de greffe demeurant similaires entre les traitements. RECELL ne supprime pas la

nécessité d'une greffe de peau, qui doit toujours être associée pour les brûlures profondes, ce qui complexifie la procédure opératoire en ajoutant une préparation cellulaire longue et technique. De plus, son application est limitée en présence d'infection active et dépend de la présence d'un lit dermique viable. Ainsi, malgré la réduction du site donneur, RECELL présente des bénéfices modestes et demeure contraint par plusieurs limitations pratiques et cliniques (Holmes et al., 2019; Iv et al., 2018).

2.10 Thérapie combinée chitosane + cellules autologues

2.10.1 Justification scientifique et biomédicale

La combinaison du chitosane avec des cellules autologues pour la cicatrisation cutanée s'appuie sur une synergie démontrée entre les propriétés bioactives du polymère et les fonctions réparatrices des cellules. Le chitosane, reconnu pour sa biocompatibilité, sa bioadhésivité, son activité antimicrobienne et son rôle dans les phases initiales de la cicatrisation, constitue une matrice idéale pour le soutien cellulaire et la libération contrôlée de molécules bioactives. Cependant, utilisé seul, il présente des limitations mécaniques et biologiques, notamment une rigidité insuffisante et une faible capacité à stimuler une régénération complète des tissus (Y. Kim et al., 2023).

L'ajout de cellules autologues telles que les fibroblastes, les kératinocytes ou les cellules souches mésenchymateuses (CSM) permet de surmonter ces limites. Ces cellules sécrètent des facteurs de croissance (VEGF, FGF, HGF, etc.) qui favorisent la prolifération, la migration et l'angiogenèse, accélérant ainsi la cicatrisation. De plus, leur action paracrine contribue à moduler la réponse immunitaire locale, à équilibrer le microenvironnement inflammatoire et à stimuler le remodelage matriciel (Huang et al., 2023; Tottoli et al., 2020; Zuliani et al., 2013).

Les études ont montré que les implants combinant le chitosane à des cellules autologues améliorent significativement la réépithélialisation, augmentent la densité dermique, accélèrent la néovascularisation et réduisent l'infiltrat inflammatoire. Dans un modèle animal, l'utilisation de sphéroïdes de cellules souches adipeuses sur une membrane chitosane-hyaluronane a permis une

fermeture plus rapide des plaies et une angiogenèse accrue, grâce à une meilleure localisation des cellules autour des microvaisseaux (Huang et al., 2023; Sarkar et al., 2013).

Cette approche combinée s'inscrit donc dans une logique translationnelle pertinente, visant à tirer parti des avantages de chaque composant pour générer une matrice bioactive capable d'orchestrer les différentes étapes de la régénération cutanée. Le chitosane assure un support structurel et une protection antimicrobienne, tandis que les cellules autologues activent les voies biologiques essentielles à une réparation efficace et durable des tissus cutanés.

2.10.2 Innovations

La combinaison du chitosane avec des cellules autologues représente une innovation majeure par rapport aux approches traditionnelles de cicatrisation cutanée. Contrairement aux pansements standards ou aux substituts cutanés acellulaires, cette stratégie bioactive permet d'agir simultanément sur plusieurs étapes critiques de la régénération tissulaire. Le chitosane offre une structure matricielle biocompatible et antimicrobienne qui favorise l'hémostase, la prolifération cellulaire et la formation de tissu de granulation, tout en réduisant le risque d'infection. L'ajout de cellules autologues, telles que les fibroblastes ou kératinocytes, renforce considérablement la qualité de la régénération en apportant des signaux paracrines, en stimulant la revascularisation et en limitant l'inflammation chronique (Kolimi et al., 2022; Sarkar et al., 2013).

Des travaux récents ont montré que les systèmes composites intégrant des biomatériaux et des cellules surpassent les substituts cutanés classiques comme Integra® ou AlloDerm®, notamment en termes de vitesse de cicatrisation et de restauration fonctionnelle de la peau. Les structures stratifiées, reproduisant l'architecture dermo-épidermique native, permettent une meilleure intégration cellulaire et une régénération plus fidèle de la jonction dermo-épidermique, en comparaison avec les approches unicouches. Ce progrès est crucial pour traiter des plaies complexes ou chroniques, où la simple couverture mécanique ne suffit plus à relancer le processus de guérison (Kolimi et al., 2022; Monteiro et al., 2015).

De plus, les études soulignent que les hydrogels ou membranes à base de chitosane, lorsqu'ils sont enrichis en facteurs bioactifs et en cellules, peuvent même dépasser certaines solutions commerciales en termes d'efficacité, en apportant des bénéfices cliniques tangibles comme une

réduction du temps de cicatrisation et une amélioration de l'esthétique du tissu cicatriciel. Ainsi, cette approche combinée représente une rupture technologique prometteuse dans le domaine de l'ingénierie tissulaire cutanée (Y. Kim et al., 2023).

2.11 Modèles expérimentaux

2.11.1 Modèles in vitro

Les modèles in vitro sont indispensables pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la cicatrisation cutanée ainsi que pour évaluer l'efficacité et la biocompatibilité de nouveaux biomatériaux ou systèmes cellulaires. Les cultures 2D, bien que limitées en termes de complexité, restent largement utilisées dans les étapes initiales des recherches. Elles permettent de tester la viabilité, la prolifération, la migration et les réponses inflammatoires des fibroblastes et kératinocytes exposés à des matrices telles que le chitosane ou des extraits biologiques. Dans l'étude de Sarkar et al. (2013), des échafaudages chitosane-collagène ont été testés avec des cellules en culture 2D pour évaluer leur aptitude à supporter l'adhésion et la croissance cellulaire (figure 2.14).

Pour mieux simuler l'environnement physiologique de la peau, les chercheurs ont recours aux modèles tridimensionnels (3D), qui reproduisent la structure en couches de l'épiderme et du derme. Ces modèles, constitués de matrices hydrogélifiées ou de structures poreuses, permettent d'intégrer différents types cellulaires dans un échafaudage biomimétique. Monteiro et al. (2015) ont développé un modèle de peau en 3D en utilisant une structure en acide hyaluronique fonctionnalisée par la technique de "layer-by-layer", favorisant une organisation cellulaire plus naturelle. Plus récemment, Roy et al. (2023) ont démontré que des fibroblastes reprogrammés mécaniquement en 3D présentaient une capacité accrue à stimuler la régénération dermique chez des animaux âgés, ce qui souligne l'intérêt des conditions tridimensionnelles pour rétablir des fonctions cellulaires altérées.

Par ailleurs, les modèles ex vivo, comme ceux utilisant des biopsies de peau humaine ou animale cultivées en condition statique ou dynamique, permettent de conserver l'architecture et la vascularisation native. Ces modèles, bien que plus complexes et coûteux, offrent une plateforme précieuse pour tester des implants cellulaires ou biomatériaux dans des conditions proches de la

réalité clinique. Dans l'étude de Hsu et al. (2015), l'utilisation de sphéroïdes de cellules souches adipocytaires a été évaluée sur des tissus ex vivo, démontrant une amélioration de la réépithélialisation et de la régénération dermique. De même, l'étude de Volk et al. (2013) met en lumière l'intérêt des modèles ex vivo dérivés de la clinique vétérinaire, soulignant leur pertinence pour explorer de nouvelles thérapies de cicatrisation dans des conditions biologiques plus réalistes.

Ainsi, l'intégration progressive de modèles 2D, 3D puis ex vivo dans les protocoles de recherche permet une validation rigoureuse et hiérarchisée des approches thérapeutiques. Cela optimise la transition vers les modèles animaux puis les essais cliniques, en renforçant la prédictivité des résultats et en réduisant le recours aux tests in vivo.

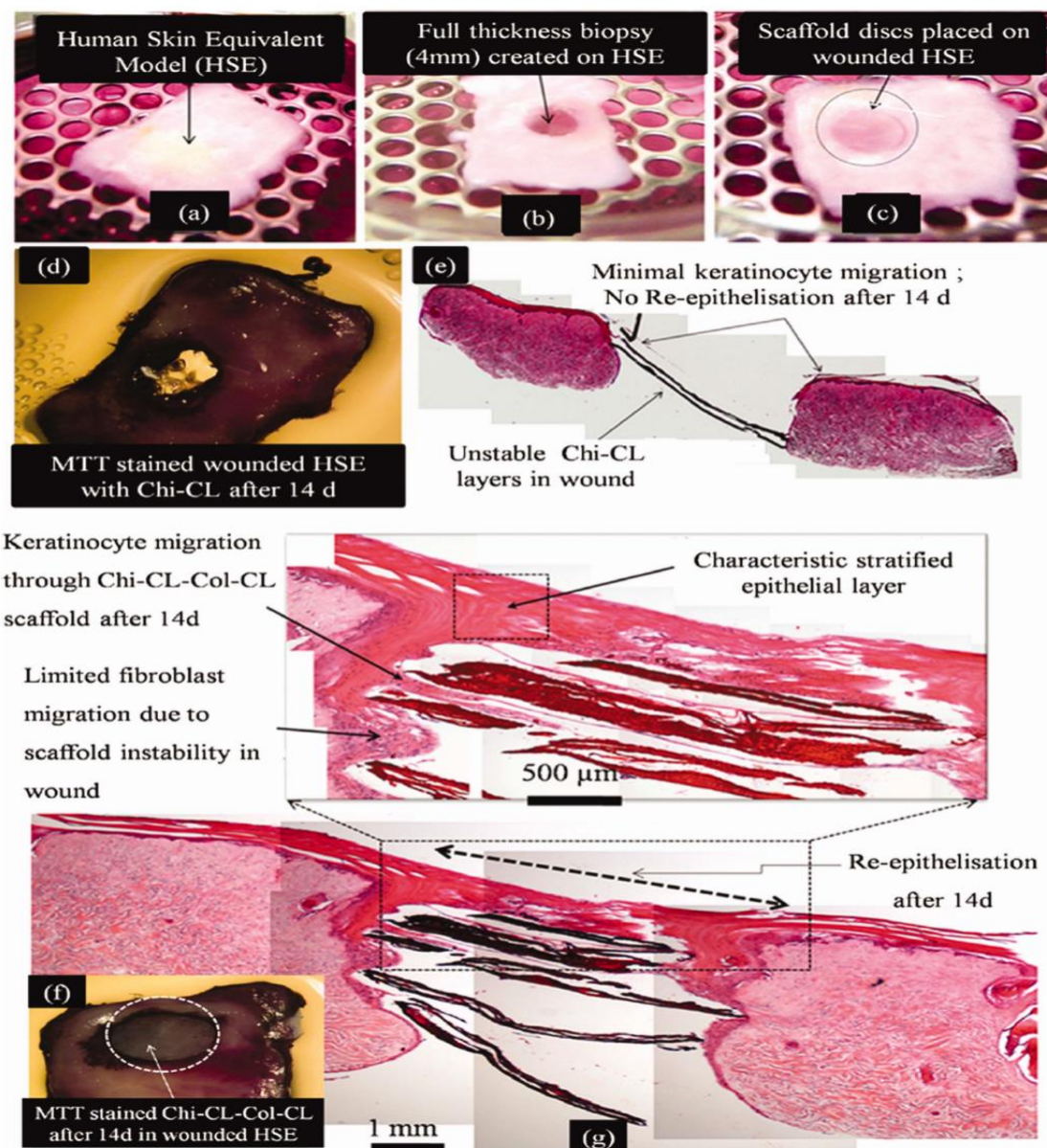


Figure 2.14 Images optiques d'un modèle de peau humaine équivalente (HSE) et de son traitement. Le modèle HSE intact, la plaie créée, et l'application d'échafaudages à base de chitosane sont présentés, ainsi que des images MTT et H&E après 14 jours de traitement par des échafaudages nanofibreux à base de chitosane ou chitosane-collagène. L'encart montre un agrandissement de la zone d'intérêt. Reproduit à partir de Sarkar et al., Journal of Biomedical Materials Research Part A (2013), avec permission de Wiley . No. 6138901110097. (Sarkar et al., 2013)

2.11.2 Modèles in vivo

Les modèles animaux in vivo constituent une étape essentielle dans la validation préclinique des thérapies avancées destinées à la régénération cutanée. Parmi eux, les modèles murins, en particulier ceux basés sur des plaies d'excision dorsale avec anneaux de rétention, permettent de contrôler la contraction cutanée, assurant ainsi une cicatrisation plus proche de celle observée chez l'humain. Ce dispositif, décrit notamment par Galiano et al. (2004) et Dunn et al. (2013), facilite la standardisation de la taille des plaies et la collecte comparative de données histologiques, mécaniques et immunologiques.

Plusieurs études ont démontré que l'application de chitosane seul ou en combinaison avec d'autres polymères (collagène, gélatine, acide hyaluronique) améliore significativement la vitesse de réépithélialisation, la qualité de la matrice extracellulaire et la vascularisation du tissu régénéré. Monteiro et al. (Monteiro et al., 2015) ont mis en évidence les bénéfices d'un hydrogel fonctionnalisé testé dans un modèle murin immunodéficient, observant une organisation tissulaire favorable. D'autres approches, telles que celles de Sarkar et al. (Sarkar et al., 2013), ont évalué l'intégration cellulaire et l'impact du support biomatériel dans des modèles animaux similaires.

L'utilisation de systèmes cellulaires plus complexes a également été évaluée. Holmes et al. (Holmes et al., 2019) ont testé le dispositif RECELL®, combiné à des autogreffes fines chez des modèles de brûlures, rapportant une réduction du besoin en peau donneuse. De leur côté, Hsu et al. (Hsu & Hsieh, 2015) ont étudié l'effet de sphéroïdes de cellules souches adipocytaires humaines dans un modèle immunodéficient, montrant une amélioration de la structure dermique et une activation accrue des fibroblastes (figure 2.15). Enfin, des recherches plus récentes, comme celles de Roy et al. (2023), ont utilisé des fibroblastes reprogrammés mécaniquement dans des échantillons de peau âgées, démontrant leur potentiel régénératif dans un contexte de peau sénescence.

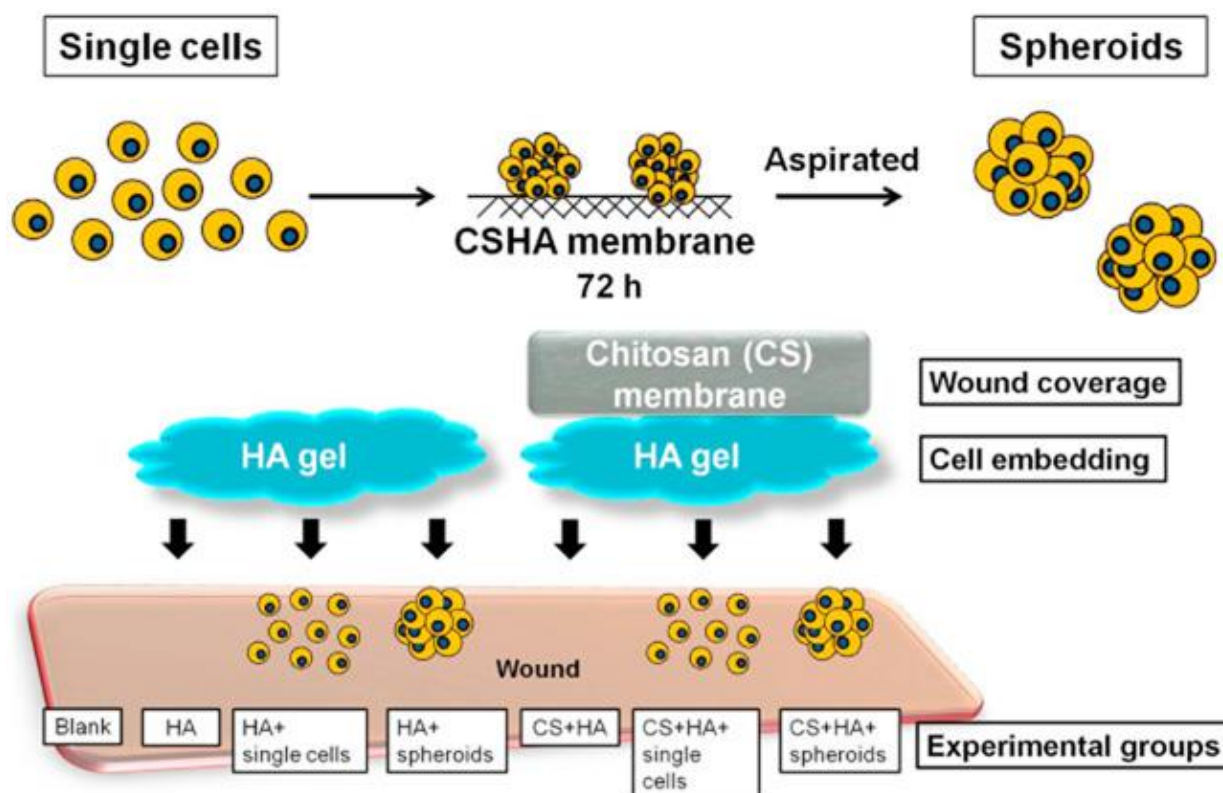


Figure 2.2.15 Schéma du protocole expérimental chez l'animal. Les cellules ont été déposées sur les plaies, qui ont ensuite été recouvertes d'un gel d'acide hyaluronique (HA) et/ou d'une membrane de chitosane poreuse et d'une gaze. Les animaux ont été répartis en sept groupes recevant un traitement témoin, le gel HA seul, des cellules ASC (cellules uniques ou sphéroïdes) recouvertes de gel HA, ou ces mêmes conditions combinées à une membrane de chitosane. Reproduit avec permission (licence n° 502031460). (Hsu & Hsieh, 2015)

Ces travaux montrent que le choix du modèle animal, de la lignée cellulaire et du type d'implant joue un rôle crucial dans l'évaluation de l'efficacité des thérapies. L'accumulation de données issues de modèles bien standardisés permet non seulement d'optimiser les formulations biomatériau-cellules mais aussi de sécuriser la transition vers les études cliniques humaines.

2.11.3 Paramètres évalués

L'évaluation préclinique de la cicatrisation cutanée repose sur un ensemble de paramètres complémentaires visant à décrire avec précision la dynamique et la qualité de la régénération tissulaire. La vitesse de fermeture de la plaie constitue un indicateur fondamental, mesurée par des photographies séquentielles et une analyse planimétrique de la réduction de la surface lésionnelle (Huang et al., 2023). Cette mesure est souvent combinée à une analyse histologique permettant

d'évaluer la réépithélialisation, l'épaisseur et l'organisation des couches cutanées, ainsi que la présence de structures annexes comme les follicules ou les glandes (Sarkar et al., 2013).

La caractérisation des propriétés mécaniques du néo-tissu est également essentielle pour apprécier sa fonctionnalité à long terme. Des études récentes ont montré que des techniques d'indentation, comme la nanoindentation, permettent de mesurer précisément le module d'élasticité des tissus réparés, à condition que la profondeur d'indentation respecte certaines limites pour éviter l'influence du substrat (Zak et al., 2022). Ces mesures, validées par des modèles éléments finis, permettent de suivre les variations locales de rigidité au cours de la cicatrisation et d'en déduire l'efficacité des traitements testés (Pensalfini & Tepole, 2023).

Ces analyses mécaniques sont souvent complétées par l'étude de la composition de la matrice extracellulaire, incluant la quantification des fibres de collagène de type I et III, leur organisation, ainsi que l'activité enzymatique de dégradation via les métalloprotéinases (ex. MMP-9). L'évaluation de la réponse inflammatoire locale constitue un autre aspect essentiel. Elle peut être réalisée par immunohistochimie (CD68, F4/80) ou par dosage des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6. En parallèle, la capacité du traitement à favoriser l'angiogenèse est évaluée par l'expression de marqueurs comme CD31 ou VEGF, ainsi que par la densité des néovaisseaux observés histologiquement (Azari et al., 2022).

La réépithélialisation est étudiée en déterminant la continuité de la couche épidermique, sa différenciation et sa stratification. La fonctionnalité barrière du néo-tissu peut être vérifiée par des tests de perte en eau transépidermique (TEWL) ou de coloration spécifique comme le bleu de toluidine (Y. Kim et al., 2023). Enfin, des marqueurs de prolifération (Ki67) et d'apoptose (TUNEL) permettent d'apprécier l'activité cellulaire au sein de la plaie. Dans certains cas, des analyses colorimétriques et informatiques permettent également de suivre la contraction, la pigmentation ou la vascularisation de la zone régénérée (figure 2.16) (Pensalfini & Tepole, 2023). L'intégration de l'ensemble de ces paramètres assure une évaluation rigoureuse et multidimensionnelle de l'efficacité des thérapies testées, tout en contribuant à la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents à la cicatrisation (Sarkar et al., 2013).

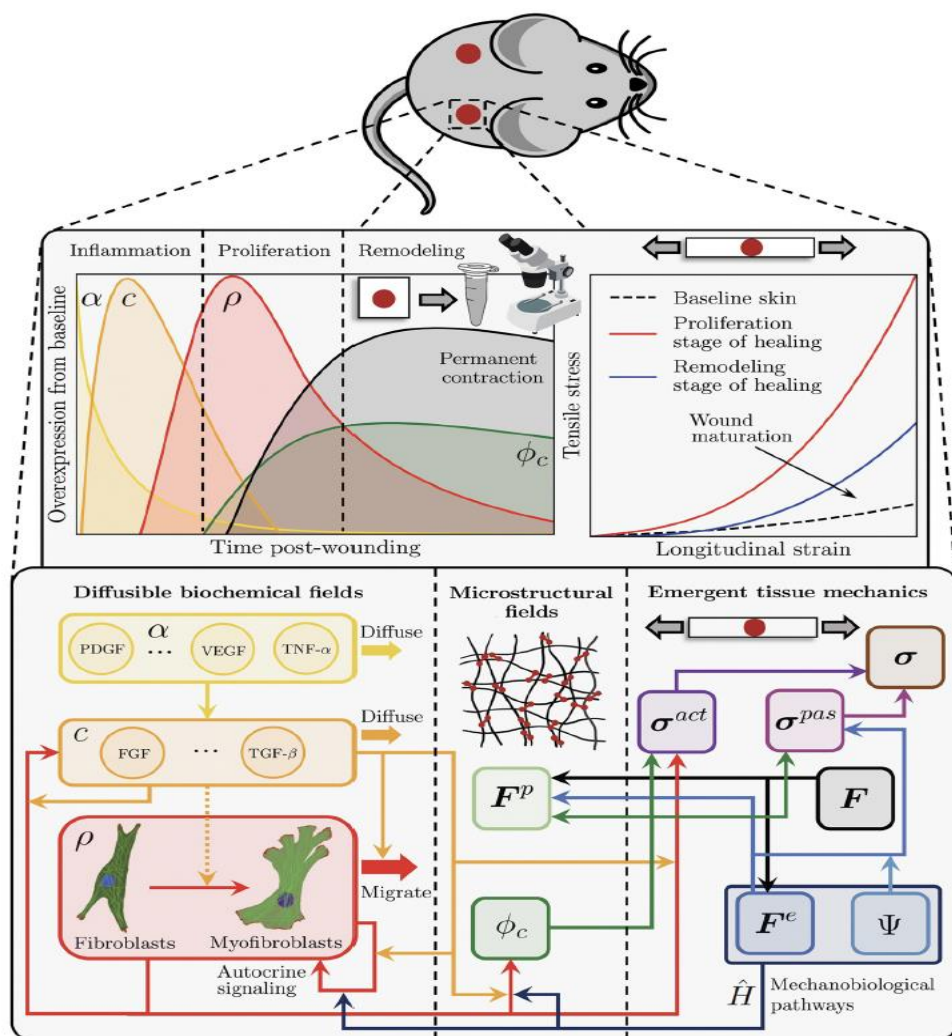


Figure 2.16 Schéma récapitulatif du modèle mécanobiologique systémique développé pour la cicatrisation cutanée. Ce modèle vise à représenter l'évolution temporelle des principales variables biochimiques, microstructurales ainsi que des paramètres mécaniques et géométriques macroscopiques, en intégrant les voies de régulation cellulaires et tissulaires et leurs interactions à différentes échelles structurales. Reproduit à partir de Pensalfini M., Tepole A.B., *PLOS Computational Biology* (2023). Sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (Pensalfini & Tepole, 2023).

À la lumière des mécanismes physiologiques de la cicatrisation cutanée et des limites des approches thérapeutiques actuelles mises en évidence dans la revue de littérature, le développement de biomatériaux combinant un support structural et des composantes bioactives apparaît comme une stratégie prometteuse pour améliorer la régénération cutanée. Le chitosane, en association avec le fibrinogène et la thrombine, constitue une matrice biomimétique susceptible de soutenir la

formation du tissu de granulation, la réépithélialisation et la récupération fonctionnelle de la peau lésée. L'intégration de cellules cutanées autologues et d'un sel d'acide gras ionique (FASSmmw) vise à renforcer ces effets en modulant l'environnement inflammatoire et en favorisant la viabilité et la rétention cellulaire au site de la plaie.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce mémoire est d'évaluer *in vivo* le potentiel d'une matrice chitosane-fibrinogène-thrombine (CFT), utilisée avec ou sans cellules cutanées autologues et/ou FASSmmw, pour améliorer la cicatrisation cutanée dans un modèle de plaie par excision dorsale chez le rat. Plus spécifiquement, ce travail vise à (i) comparer l'évolution de la réépithélialisation et de l'organisation du tissu de granulation entre les différentes formulations de la matrice CFT et les groupes contrôle, (ii) analyser l'impact de l'ajout de cellules autologues et du FASSmmw sur l'inflammation, la vascularisation et la maturation du collagène, et (iii) évaluer les propriétés mécaniques non destructives de la peau en cours de réparation au jour 14 post-lésion.

CHAPITRE 3 ARTICLE 1: CHITOSAN-FIBRINOGEN- THROMBIN MATRIX ACCELERATES RE- EPITHELIALIZATION AND CORNIFICATION IN A RAT WOUND HEALING MODEL

Hind Lerhcha¹ (hind.lerhcha@etud.polymtl.ca), Anik Chevrier² (anik.chevrier@polymtl.ca), Marc Lavertu^{1,2} (marc.lavertu@polymtl.ca)

¹Biomedical Engineering Institute and ²Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montreal, Montreal, QC, Canada

Manuscript submitted to npj Regenerative Medicine (November 25, 2025)

3.1 Préambule: Étude Préliminaire

Une première expérimentation a été menée dans le but de tester la faisabilité technique et biologique du modèle animal retenu ainsi que la tolérance et la manipulation de l'implant chitosane-cellules. Bien que cette expérimentation ne constitue pas l'étude principale de ce mémoire, elle a été réalisée en amont afin d'éclairer les choix méthodologiques et d'identifier les éléments clés nécessaires à la mise en place de l'étude in vivo définitive présentée par la suite.

Cette étude exploratoire visait principalement à valider l'approche chirurgicale, la préparation des formulations et les paramètres de suivi in vivo avant d'engager une étude complète. Elle a permis d'identifier des limites méthodologiques importantes ayant directement impacté la qualité et l'interprétation des résultats obtenus.

L'objectif principal de cette étude préliminaire était de vérifier la compatibilité du biomatériau avec le modèle animal, ainsi que la stabilité du système de contention mécanique permettant d'éviter la contraction naturelle de la plaie. En effet, chez le rat, la cicatrisation se fait principalement par contraction, un phénomène qui fausse l'évaluation des traitements visant à stimuler la régénération tissulaire.

L'étude a été conduite sur 24 rats Sprague-Dawley mâles âgés de 4 semaines, avec un poids moyen compris entre 100 et 125 g. Chaque animal a reçu deux plaies dorsales de pleine épaisseur, réalisées à l'aide d'un biopsy punch de 8 mm de diamètre, positionnées de part et d'autre de la ligne médiane, entre les omoplates et la région lombaire.

Une fois les biopsies réalisées, un anneau circulaire en silicone (Grace Biolabs, 10 mm, Sigma, No catalogue GBLRD476684) a été apposé autour de chaque plaie. Ce splint a été fixé à la peau à l'aide de six points de suture cutanée, en veillant à une répartition équilibrée pour assurer un contact homogène avec la surface cutanée. L'objectif de cette étape était de bloquer la contraction périphérique du tissu et de forcer une cicatrisation centrée sur les phénomènes de régénération dermo-épidermique.

Après fixation des splints, les différents traitements ont été appliqués directement dans les plaies. Huit conditions expérimentales ont été testées, incluant des contrôles (gel neutre, chitosane seul, thrombine/fibrinogène, cellules seules), des combinaisons binaires et la formulation complète contenant chitosane, thrombine, fibrinogène et cellules autologues. Chaque formulation était administrée immédiatement après la création des plaies, à l'aide d'un système à double seringue muni d'un mélangeur statique pour assurer l'homogénéité du mélange.

Les plaies traitées étaient ensuite recouvertes d'un pansement multicouche afin de limiter l'exposition aux frottements et aux contaminations.

À la fin de la période d'observation (J35), les zones cicatrisées ont été excisées pour analyses tissulaires. Trois échantillons de peau par animal ont été collectés : une cicatrice gauche, une cicatrice droite et un fragment de peau saine servant de contrôle interne.

Parallèlement, des tests mécaniques ont été réalisés sur les échantillons congelés à -80 °C, puis décongelés lentement à 4 °C avant manipulation. La rigidité des tissus cicatrisés a été mesurée par indentation à l'aide du système Mach-1™, selon un masque de points prédéfinis. Les paramètres extraits comprenaient l'épaisseur du tissu et le module instantané d'élasticité (instantaneous modulus), permettant une évaluation objective de la qualité biomécanique du tissu réparé.

Pour l'analyse histologique, les tissus ont été fixés dans du formol tamponné à 10 % puis inclus en paraffine. Des coupes de 5 μ m ont été réalisées puis colorées avec l'Hématoxyline-Éosine (H&E) pour l'évaluation générale de la structure tissulaire, et le Trichrome de Masson pour la quantification du collagène. Les critères évalués incluaient la revascularisation, la réépithélialisation, la densité cellulaire, la formation de follicules, et l'organisation du derme. Un score histologique semi-quantitatif a été attribué à chaque paramètre selon une échelle définie en amont.

Malgré la qualité globale de la préparation des implants et la réussite de la chirurgie dans les premières heures post-opératoires, un obstacle majeur a compromis l'analyse finale : la majorité des splints en silicone se sont décollés ou rompus dans les jours suivant la pose. Cette défaillance a entraîné une contraction rapide et incontrôlée des plaies, modifiant radicalement la dynamique de cicatrisation attendue (figure 3.1).

En conséquence, les surfaces analysées histologiquement et mécaniquement ne correspondaient plus à des conditions standardisées, introduisant des biais importants. Les valeurs de rigidité, de densité de collagène ou d'épaisseur tissulaire ne pouvaient plus être directement reliées aux effets intrinsèques des formulations, mais étaient influencées par des facteurs mécaniques externes non maîtrisés.

Cette phase exploratoire a toutefois permis de valider plusieurs aspects critiques, notamment la faisabilité de la chirurgie, la compatibilité des implants, et la robustesse des techniques d'analyse. Le principal enseignement réside dans la nécessité d'un système de contention plus résistant.



Figure 3.1 Macroscopic view of rat N at day 18 post-injury, showing detachment of the splint from the left wound site.

Abstract

Cutaneous wound healing involves complex interactions between cells, growth factors, and the extracellular matrix. Biomaterial-based therapies offer structural and bioactive support to promote regeneration. Chitosan is recognized for its biocompatibility, biodegradability, and pro-healing properties. This study evaluated a chitosan-fibrinogen-thrombin (CFT) matrix enriched with autologous skin cells to enhance wound closure and regeneration. The matrix also contained a fatty acid sodium salt (FASS) as a strategy to further promote skin repair. A rat excisional wound model compared six treatments: CFT with or without autologous cells and/or FASS, lubricating jelly, and cell suspension alone. Wounds were splinted and assessed at Day 14. Mechanical properties were tested by indentation (tissue thickness, force at 10% strain), while histolostaining (Hematoxylin and Eosin, Masson's Trichrome, Picrosirius Red) and immunostaining (CD31, CD68, Neutrophil elastase, Arginase-1) evaluated epithelialization, inflammation, angiogenesis, and collagen

remodeling. CFT-treated wounds formed a compact crust that supported keratinocyte migration, unlike Jelly and Cells groups which had delayed closure. Rhodamine-labeled chitosan persisted in granulation tissue at Day 14 with inflammatory cells, indicating gradual degradation. All wounds remained in active repair, with CFT groups showing more advanced epithelialization and cornification, but no significant benefit from adding cells or FASS. CD31 and CD68 staining showed greater angiogenesis and presence of macrophages in all wounds versus native skin, especially in Jelly and Cells groups, indicating earlier repair phases. Picrosirius red revealed immature collagen in all treated wounds. Mechanical testing showed wound thickness and resistance similar to native skin, suggesting near-functional recovery despite incomplete maturation. The main effect came from the intrinsic properties of the CFT matrix, which provided a biocompatible barrier promoting granulation and keratinocyte migration and showed strong regenerative potential as a stand-alone bioactive dressing and a basis for future long-term studies.

Keywords: Chitosan, fibrinogen, thrombin, wound healing, biomaterial, keratinocyte migration, angiogenesis, indentation testing, inflammation, collagen remodeling

3.2 Introduction

The skin represents the largest organ of the human body and serves as the primary barrier protecting against physical, chemical, and microbial insults. Beyond its mechanical function, it plays crucial roles in thermoregulation, hydration, sensory perception, and immune defense. Any disruption of skin integrity can therefore have serious consequences, ranging from infection and fluid loss to chronic disability (Jiang et al., 2022). To counteract such damage, the body activates a complex and tightly regulated wound healing program. This process unfolds through four overlapping and interdependent phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. In acute wounds, these phases occur in a coordinated manner that ultimately restores tissue continuity and functionality (Ongenaes et al., 2001). In contrast, chronic wounds, including diabetic ulcers, venous ulcers, and pressure sores, frequently stall in the inflammatory stage, resulting in impaired healing, prolonged tissue dysfunction, and an increased risk of complications. These chronic wounds represent a major clinical challenge and impose a significant socioeconomic burden worldwide (Xiao, 2020).

Despite considerable progress in wound management, current therapeutic approaches remain limited. Standard interventions such as dressings, topical agents, negative pressure wound therapy, and split-thickness skin grafts contribute to wound closure but often fail to restore full functional and structural integrity (Mahajan et al., 2024). Moreover, these strategies are associated with variable efficacy, high costs, and prolonged treatment times. Cell-based therapies have been introduced in recent years as a means of enhancing tissue regeneration (Chermnykh et al., 2018; Dieckmann et al., 2010). Among these, the RECELL® system has demonstrated improved re-epithelialization using autologous skin cell suspensions. However, its broader clinical application is hindered by several technical challenges, including significant cell loss during application, heterogeneous distribution across the wound bed, and difficulties in maintaining high cell viability at the injury site (Holmes et al., 2019). These limitations highlight the need for novel biomaterial-based approaches that not only support cell delivery but also actively promote tissue regeneration.

Biomaterials derived from natural polymers have attracted increasing attention in this regard. Chitosan, a polysaccharide obtained from chitin deacetylation, has emerged as a particularly promising candidate. Its inherent biocompatibility, biodegradability, antimicrobial activity, and hemostatic properties make it highly suitable for wound healing applications (Aranaz et al., 2021; Q. Chen et al., 2022). Furthermore, chitosan exhibits favorable interactions with skin cells, enhancing adhesion, migration, and proliferation. When used as a scaffold in combination with autologous cells such as keratinocytes or fibroblasts, chitosan can provide a bioactive microenvironment that fosters tissue regeneration while minimizing immunological risks associated with allogeneic materials (Levengood & Zhang, 2014).

Our laboratory has previously developed a chitosan-based lyophilized formulation that augments soft tissue repair. This formulation contains chitosan with number average molar mass (M_n) 32-55 kDa and 80-86% degree of deacetylation (DDA, the fraction of glucosamine monomers), trehalose as a lyoprotectant and calcium chloride. This lyophilized formulation was initially designed to be solubilized in autologous platelet-rich plasma (PRP) and injected into the body where it solidifies *in situ* to improve rotator cuff, meniscus and cartilage surgical repair (Chevrier et al., 2021; Delvaux et al., 2025; Dwivedi et al., 2019). However, we found that solidification of the biomaterial was fairly slow and inconsistent (Chevrier & Lavertu, 2025). In the current study, we therefore elected to incorporate thrombin and fibrinogen to the chitosan formulation instead of PRP in order to

achieve a quicker and more predictable solidification time to facilitate handling and administration. We also incorporated autologous skin cells and a medium molecular weight fatty acid sodium salt (FASSmmw) to the biomaterial since fatty acids have previously been shown to improve skin healing through stimulation of angiogenesis, promotion of cell migration and regulation of the immune response (Cardoso et al., 2004; Zhang et al., 2010; Zong et al., 2020).

Thrombin plays a dual role in enhancing cutaneous wound healing. On the one hand, it stimulates cells to release extracellular vesicles enriched with pro-angiogenic and anti-inflammatory factors, thereby promoting endothelial cell proliferation, fibroblast migration, angiogenesis, and faster wound closure (Sung et al., 2019). On the other hand, within our biomaterial, thrombin ensures rapid coagulation of the matrix, which we expected would stabilize the implant and prevent the dispersion of autologous cells, allowing them to remain in close contact with the wound bed and exert their regenerative effects. Fibrinogen contributes to wound healing by forming a provisional fibrin matrix that not only stops bleeding but also provides a scaffold for fibroblast, keratinocyte, and endothelial cell migration, while modulating inflammation and supporting angiogenesis (Bayer, 2022).

In this context, we hypothesized that an implant composed of chitosan/fibrinogen/thrombin (CFT), a FASSmmw, and autologous skin cells, can improve local autologous cell viability, thereby accelerating the wound healing process. To test this hypothesis, we evaluated this biomaterial formulation in a rat excisional wound model. Healing kinetics, the quality of regenerated tissue, and both histological and mechanical outcomes were compared between treated groups and control groups (CFT matrix alone, lubricating jelly and autologous cells suspension). This study aimed to establish the potential of this multifunctional implant as a promising approach for enhancing cutaneous wound repair.

3.3 Methods

3.3.1 Model and study design

Twenty-two male Sprague-Dawley rats (4 weeks old, > 100 g at surgery) were included in this study. Animals were housed under standard conditions with ad libitum access to food and water and were acclimated for at least 7 days prior to surgery. The « Comité de déontologie de

l'expérimentation sur les animaux» (CDEA) of the University of Montreal reviewed and approved the ethics protocol CDEA 25-001. All procedures followed institutional ethical guidelines for animal experimentation.

Rats were anesthetized with isoflurane delivered in two phases: induction in a plexiglass chamber (oxygen flow 1 L/min, isoflurane 5%) until loss of consciousness, followed by maintenance under a nose–mouth mask (oxygen 1 L/min, isoflurane 1–4% depending on surgical depth). Each animal was placed on a heating pad during the procedure to maintain body temperature. Sustained-release buprenorphine (1.2 mg/kg, subcutaneous) was administered preoperatively to provide extended postoperative analgesia.

Following shaving and application of a depilatory cream, two full-thickness excisional wounds were created on the dorsum of each rat using 8-mm biopsy punches. The skin was gently lifted with forceps, and tissue was excised with scissors (Dunn et al., 2013). To prevent contraction and preserve wound geometry, each site was fitted with a retaining ring. Two different types of rings were tested on a small number of rats ($n=4$) initially: 1) Homemade silicon rings 10 mm inner diameter, punched out of Grace Bio-Labs silicone isolator sheet material 0.5mm thickness (Sigma, Product # GBL664581) were tested on two rats; 2) Stainless steel rings 3/8" inner diameter (Paulin Model # 5061-020, purchased at the local hardware store) were tested on two rats. All rings were secured with Vetbond adhesive (CDMV, Product # 1469SB) and six Ethicon 3-0 sutures (Dufort Lavigne, Product # JOJ8683G). A photograph was taken of each wound alongside a calibrated ruler to record baseline size. During subsequent bandage changes, we found that several silicon rings had been lost. The rats with silicon splints were therefore removed from further analysis and the wounds in the remaining $n=18$ rats were secured with stainless steel rings.

The chitosan cakes were prepared as lyophilized matrices (2 mL each in 5 mL glass vials) containing 1% (w/v) chitosan (M_n 39 kDa, DDA 83.3%) with 10% (v/v) rhodamine-labeled chitosan as tracer (both chitosans produced in-house), 1% (w/v) trehalose (Pfanstiehl, Product # T-104-4), and 42 mM calcium chloride (Spectrum, Product # CA140-500G). The 55h lyophilisation cycle consisted of: 1) A freezing phase (Step cool to 5°C then isothermal for 30 minutes, Step cool to -5°C then isothermal for 30 minutes, Step cool to -35°C then isothermal for 150 minutes); 2) A primary drying phase (Ramp to -7°C then isothermal for 1925 mins, Ramp to 40°C then isothermal

for 360 mins, Ramp to 20°C, all at 67 mTorr); 3) A secondary drying phase (isothermal 20°C for 6h at 67 mTorr). For use, each lyophilized cake was reconstituted with 0.8 mL of sterile water for injection (CDMV, Product # 116853) and 0.2 mL of thrombin (200 U/mL) (Sigma, Product # T7009), yielding a chitosan–thrombin solution.

Autologous cells were isolated intraoperatively from the two 8-mm skin biopsies. Biopsies were rinsed in Ringer's lactate (Dufort Lavigne, Product # BAXJB2324) and incubated in 0.5% Trypsin-EDTA (ThermoFisher, Product # 15400054) at 37 °C for 30 minutes. Tissue fragments were then mechanically disaggregated with a scalpel and forceps. The cells were resuspended in Ringer's lactate and filtered through a 40- μ m strainer. 200 μ L of the cell suspension was mixed with 200 μ L fibrinogen (120 mg/mL) (Sigma, Product # F4883) and 200 μ L FASSmmw (150 mg/mL), provided by a third party. Viable cell counts were measured post-administration and were found to be similar in all groups (Table 3.1).

A double-syringe system equipped with a static mixer (Nordson Medical, Product # SA-3678) was used to combine the chitosan-thrombin solution with the autologous cells-fibrinogen-FASSmmw mixture (1:1 ratio) before application until the wounds were filled. The CFT mixtures containing FASSmmw were opaque and already paste-like at application while the CFT mixtures devoid of FASSmmw were clear and liquid at application but solidified within a few seconds (Figure 3.2). Treated wounds were photographed immediately after application.

A semi-occlusive dressing (Mepitel, Dufort Lavigne, Product # MOL290510) was applied to each wound, ensuring the adhesive portion adhered only to the retaining ring. Protective gauze was placed over the dressed wound, followed by a transparent film dressing (Suresite, Dufort Lavigne, Product # MEDMSC2302) and tubular gauze and self-adhering cohesive bandage with limb openings to prevent animals from interfering with wounds while allowing free movement.

Animals were randomly assigned to groups, with each wound receiving a different treatment. Wounds were monitored throughout the study, with serial photographs collected at bandage change every 3-4 days for macroscopic assessment of wound closure. On Day 14, animals were euthanized and the skin on the back of the rats was shaved, harvested, wrapped in PBS-soaked gauze, placed in Biohazard bags and frozen at -80°C for future mechanical and histological analyses. No stainless

steel ring was lost throughout the study from the twenty rats and therefore there were no wounds excluded from analysis.

Experimental groups included (Table 1):

- **CFT Cells+ FASSmmw+**: chitosan, fibrinogen, thrombin, with autologous cells and FASSmmw.
- **CFT Cells- FASSmmw+**: chitosan, fibrinogen, thrombin, without cells, with FASSmmw.
- **CFT Cells+ FASSmmw-**: chitosan, fibrinogen, thrombin, with autologous cells, without FASSmmw.
- **CFT Cells- FASSmmw-**: chitosan, fibrinogen, thrombin only.
- **Jelly**: lubricating jelly alone (Medline, Product # MEDM199110B).
- **Cells**: autologous cells alone (70 μ L cell suspension).

Table 3.1 Experimental groups.

Group	CFT Cells+ FASSmmw+	CFT Cells- FASSmmw+	CFT Cells+ FASSmmw-	CFT Cells- FASSmmw-	Jelly	Cells
Chitosan	1% w/v	1% w/v	1% w/v	1% w/v	-	-
Trehalose	1% w/v	1% w/v	1% w/v	1% w/v	-	-
CaCl ₂	42 mM	42 mM	42 mM	42 mM	-	-
Thrombin	20 U/mL	20 U/mL	20 U/mL	20 U/mL	-	-
Fibrinogen	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL	-	-
FASSmmw	2.5% w/v	2.5% w/v	-	-	-	-
Viable cells	4.2 X 10 ⁶ /mL	-	5.4 X 10 ⁶ /mL	-	-	4.4 X 10 ⁶ /mL
Number of wounds treated	n=7	n=7	n=7	n=6	n=6	n=7

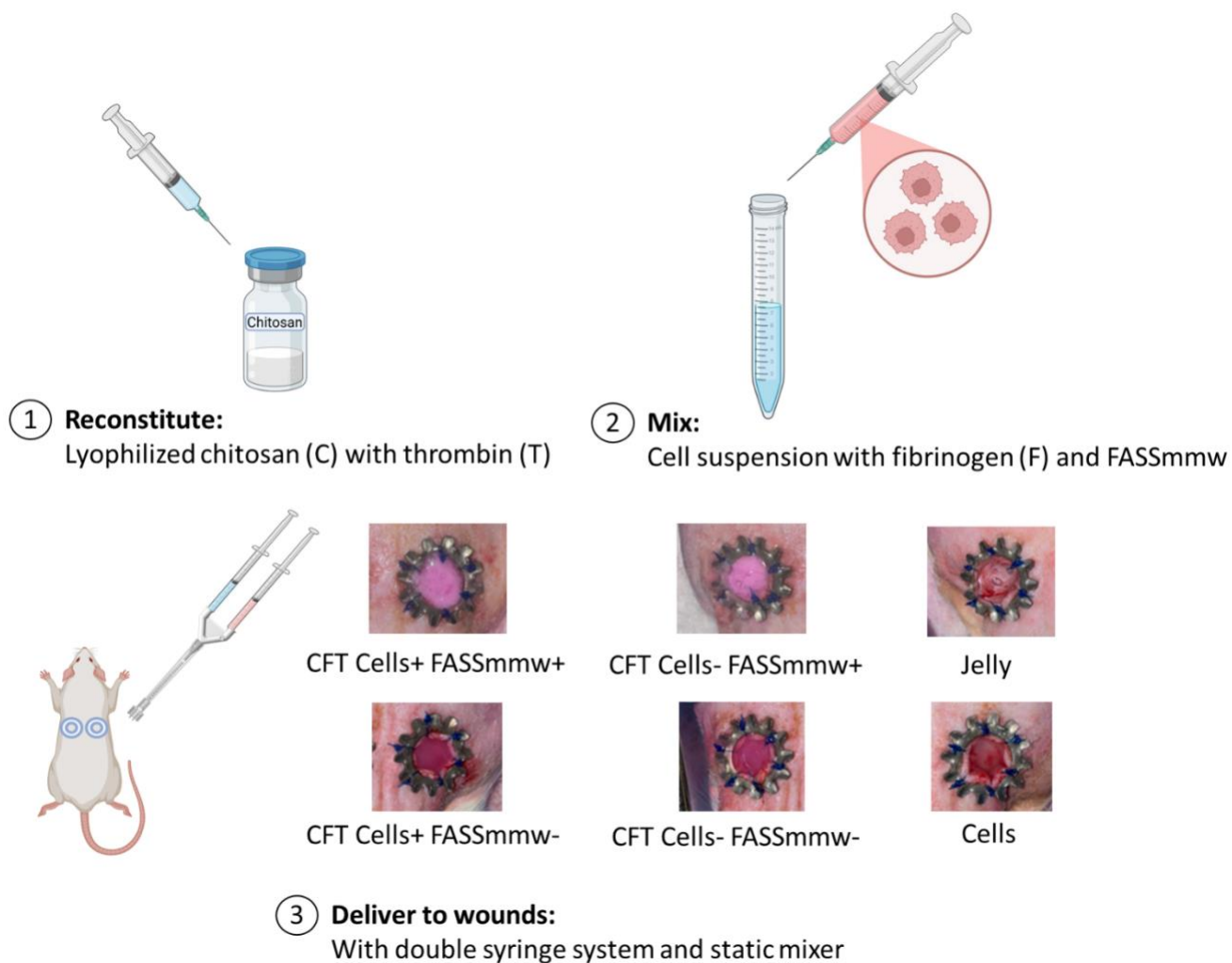


Figure 3.2 Preparation and delivery of formulations for wound treatment in rats. (1) Lyophilized chitosan (C) was reconstituted with water for injection and thrombin (T). (2) Autologous cell suspensions were isolated and combined with fibrinogen (F) and FASSmmw solution before mixing. (3) The two components (C+T and cells+F+FASSmmw) were combined using a double-syringe system equipped with a static mixer and delivered directly into excisional wounds surrounded by retaining stainless steel rings. Figure created with Biorender.

3.3.2 Mechanical Analysis

Mechanical properties of the repaired skin were evaluated using indentation testing with the MACH-1 mechanical tester (Biomomentum Inc.) equipped with a 0.25 N uniaxial load cell and a 2-mm spherical indenter. To prepare for analysis, samples were thawed overnight at 4 °C and retrieved immediately before testing to ensure tissue hydration and preserve structural integrity. 16 mm X 16 mm plastic dies were used to isolate each wound and surrounding tissues with razor blades and to isolate the native skin samples well away from the surgical sites in seven randomly chosen rats.

Prior to each session, the MACH-1 system was calibrated with a 6.5 g standard weight, and the z-axis was zeroed on the surface of the sample holder to enable precise determination of tissue thickness. Each specimen was placed flat on the testing stage over a drop of PBS to maintain hydration and stability. Using the Mach-1 Mapping Toolbox, a digital map was created to standardize testing, with five evenly distributed points defined across each wound sample.

At each testing location, a stress–relaxation protocol was performed: the indenter applied a rapid compression corresponding to ~15% of the local tissue thickness (typically 0.3–0.9 mm) at a velocity of 0.5 mm/s, followed by a 2-second hold. Force–displacement curves were recorded at a sampling rate of 1 kHz.

Following acquisition, raw data from the curves were exported and analyzed using custom Python scripts. This allowed automated extraction of mechanical parameters including thickness and force at 10% depth penetration. Throughout all measurements, specimens were kept hydrated with PBS to ensure consistent biomechanical evaluation.

3.3.3 Histology

After mechanical testing, wound tissues and surrounding skin were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin (Fisher, Product # SF100-4), dehydrated, and embedded in paraffin (Fisher, Product # 22-900-700). Paraffin blocks were sectioned at 5 µm thickness using a rotary microtome (2 blocks per wound). Sections were mounted on Superfrost Plus™ glass slides (Fisher, Product #

12-550-15), air-dried, and stored at room temperature until hematoxylin and eosin (H&E), Masson's Trichrome (MT) and Picrosirius red (PSR) staining.

MT-stained sections were scored by a single blinded observer using an in-house developed scoring system adapted from existing systems (Table 3.2)(*Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in Rats - PMC*, n.d.; van de Vyver et al., 2021).

For immunostaining, sections were dewaxed, rehydrated and subjected to antigen retrieval in Tris-EDTA pH 9 at 60°C. Sections were treated with 0.3% Triton X-100/PBS and 3% H₂O₂/PBS and then blocked with 3% BSA/5% milk powder/PBS. Sections were incubated with the primary antibody solution diluted in 1% BSA/PBS (CD31, Abcam, Product # ab281583, dilution 1:4000; Neutrophil elastase, Abcam, Product # ab314946, dilution 1:250; Arginase-1, Abcam, Product # ab203490, dilution 1:150; CD68, Abcam, Product # ab283654, dilution 1:200) overnight at 4°C. Sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (Abcam, Product # ab97049 diluted 1:500 in 1% BSA/PBS) for 1h at room temperature. Revelation was with avidin biotin complex-horseradish peroxidase (ABC-HRP) and diaminobenzidine (DAB) kits (Vector, Product # PK-6100 and SK-5100). Sections were counterstained with Harris hematoxylin (Cedarlane, Product # 26116-07) and then dehydrated and mounted with Permount (Fisher, Product # SP15-100). Negative controls were incubated with the secondary antibody only.

Table 3.2 Microscopic scoring of rat skin

Score each category separately		Score
A	Scab	
	SEVERE – Scab covers 100% of the initial wound	0
	MODERATE	1
	DISCRETE	2
	ABSENT – No evidence of scab	3
B	Inflammation	
	SEVERE – Exaggerated inflammatory cellularity	0
	MODERATE	1
	DISCRETE	2
	ABSENT – No evidence of inflammation	3
C	Extracellular matrix (ECM) deposition	
	ABSENT – Mainly granulation tissue	0
	DISCRETE	1
	ADVANCED	2

	COMPLETE - Mainly organized ECM with few fibroblasts, and thick collagen fibers arranged in bundles	3
D	Epithelialization	
	ABSENT – No re-epithelialization	0
	DISCRETE	1
	ADVANCED	2
	COMPLETE – 100% of the initial wound is covered with epithelium	3
E	Cornification	
	ABSENT – No keratin layer	0
	DISCRETE	1
	ADVANCED	2
	COMPLETE – Complete keratin deposition with distinguishable layers and/or parakeratotic stratum corneum	3
F	Remodeling	
	ABSENT – No evidence of remodeling	0
	DISCRETE	1
	ADVANCED	2
	COMPLETE-Same amount of skin appendages and dermal white adipose tissue as normal skin	3

3.3.4 Statistical analysis

For mechanical analyses, five distinct points were measured on each sample. An in-house developed Python code was used to extract the data (Thickness and force at 10% depth penetration). The Mixed Model task in SAS on Demand for Academics was used for analysis specifying treatment as a fixed effect and rat number as a random effect.

Several parameters were qualitatively assessed on MT-stained sections by a single blinded observer as per Table 2. Two sections per wound were scored and then averaged to obtain a single score per wound. Kruskal-Wallis analyses were performed with GraphPad Prism 10.

The sections immunostained with CD31 and CD68 were scanned with a Nanozoomer RS. Two 20X magnification brightfield images (0.434 mm²) taken immediately underneath the epidermis were exported using NDPView 2 software. Polarized light microscopy (PLM) images of the picrosirius red-stained sections were acquired with a Zeiss Axiolab microscope. Two 20X magnification PLM images (0.197 mm²) were acquired from each section immediately underneath the epidermis. Hue saturation value (HSV)–based thresholding was used to quantify the areas of CD31 and CD68 positive tissues (on brightfield images) and of red-yellow positive tissues and of

green positive tissues (on PLM images). A constant set of HSV threshold limits was selected with the Threshold Colour ImageJ plugin and used for every image analysed. For CD31 and CD68, the percentage of staining, which corresponds to the number of positively stained pixels/total number of pixels $\times 100$, was calculated with an in-house Matlab routine. The ratio of mature (red-yellow) to immature (green) collagen was calculated using area measurements. Shapiro-Wilk normality testing and One-way ANOVA with post-hoc Tukey analyses were performed with GraphPad Prism 10. $p < 0.1$ was considered trending and $p < 0.05$ was considered significant.

3.4 Results

3.4.1 CFT Matrix Formed a Protective Barrier on Top of Wounds and Re-Epithelialization Occurred Underneath

To document the macroscopic evolution of the wounds, images were taken at every bandage change until Day 14. The CFT-treated wounds consistently developed a thick crust-like protective barrier covering the splinted area, whereas no visible crust was observed in the Jelly or Cells groups. To illustrate this difference, in Figure 2, photographs were acquired first with the splint and crust in place at Day 14, and then after the removal of the rings and shaving of the skin to expose the underlying tissue. Re-epithelialization occurred underneath this protective barrier in the CFT-treated wounds as shown on histological sections of the same wounds. In contrast, in Jelly and Cells groups, keratinocytes were readily observed migrating from the edges of the wounds towards the center.

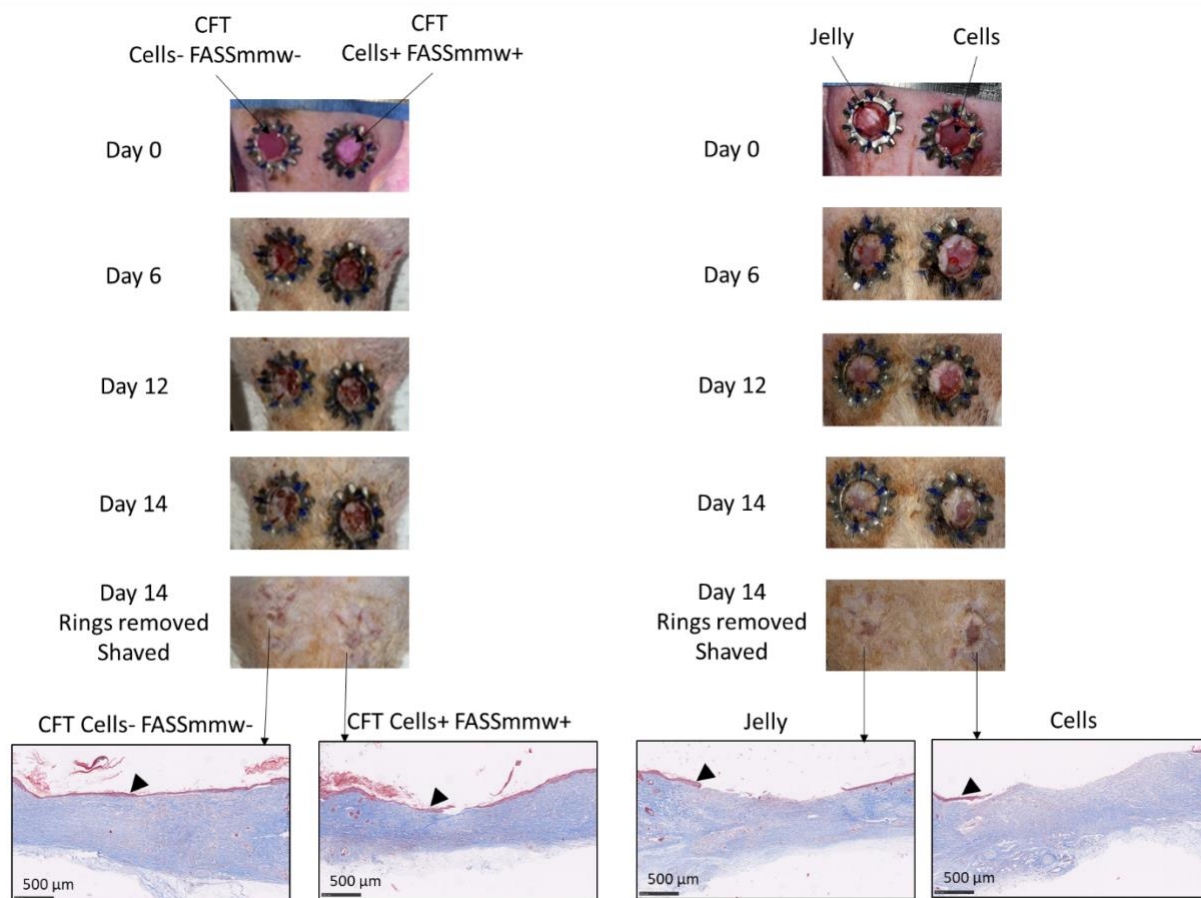


Figure 3.3 Macroscopic images of wounds treated with CFT Cells+ FASSmmw+, CFT Cells- FASSmmw-, Jelly and Cells. MT-stained histological images of these same samples showing re-epithelialization underneath the CFT matrix that was much less abundant in the Jelly and Cells groups. Black arrowheads point to neo-epidermis.

3.4.2 Chitosan Persisted within the Granulation Tissue until Day 14

At Day 14, rhodamine-labeled chitosan was still detectable within the wound bed of all but one wound treated with CFT matrix (Figure 3.4). Histological examination revealed its persistence mainly in the mid to lower regions of the newly formed dermis. Observation at high magnification confirmed that many of the labeled chitosan particles were present within cells, presumably phagocytic cells such as neutrophils and macrophages. These findings demonstrate that rhodamine-

labeled chitosan persists in the granulation tissue for at least 14 days and is often associated with inflammatory infiltrates.

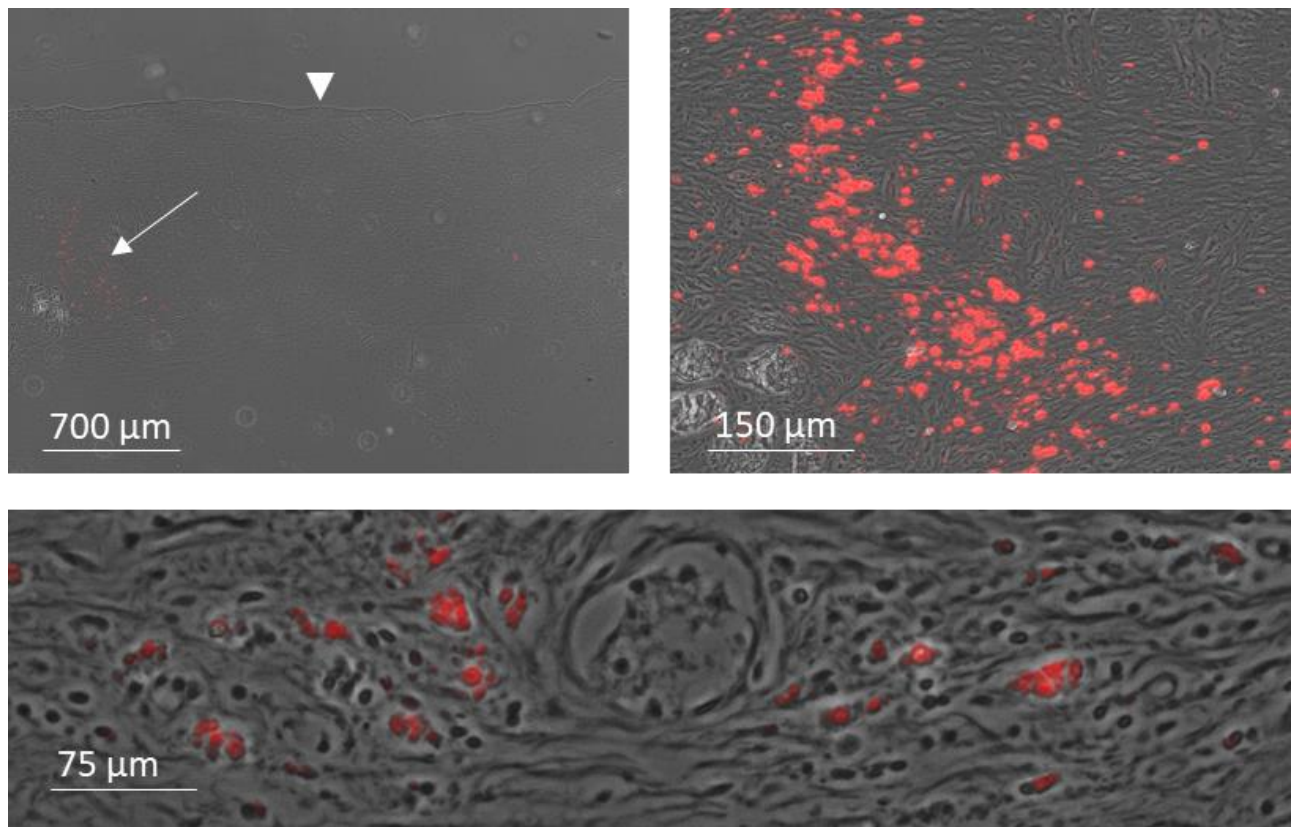


Figure 3.4 White arrow points to rhodamine-chitosan particles in the mid to bottom part of the dermis in a wound treated with CFT Cells+ FASSmmw+. White arrowhead points to neo-epidermis.

3.4.3 All Treated Wounds Exhibited Structural Abnormalities at Day 14

H&E-stained sections revealed clear differences between all wounds and native skin at Day 14 (Figure 3.5). The wound margins were readily identifiable in all groups. In many wounds, the granulation tissue presented a dense inflammatory infiltrate. Appendages within the newly formed dermis were few. In many wounds, re-epithelialization remained incomplete. While some wounds showed a more advanced epithelial coverage, with a continuous epithelial layer, the tissue remained less organized compared to native skin. By contrast, native skin exhibited a fully stratified and mature epithelium, an organized dermal architecture, and normal appendages, underscoring the gap between wounded and physiological skin structure.

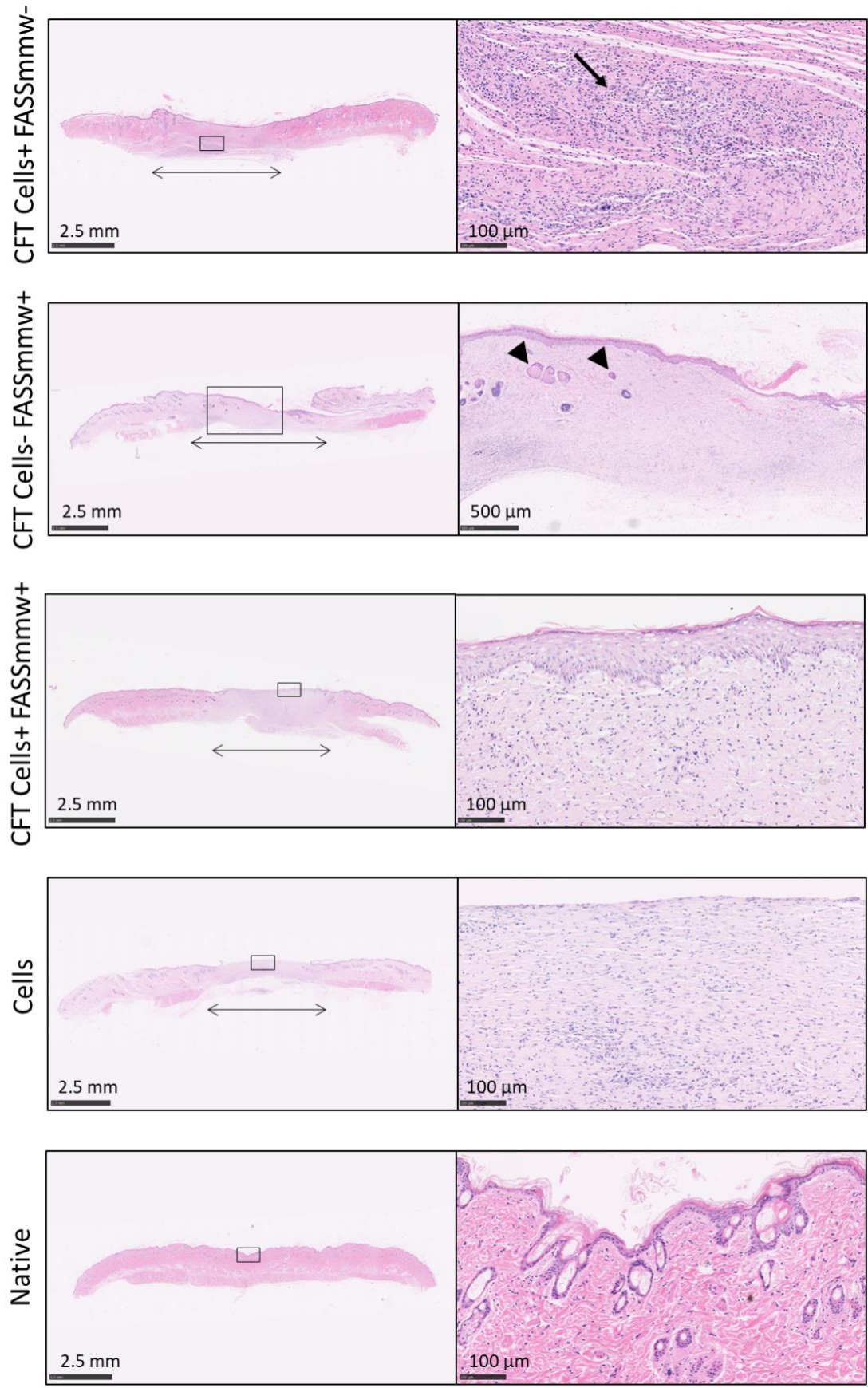


Figure 3.5 H&E-stained sections of treated wounds and native skin. Double arrows show the margins of the wounds and insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. Black arrow points to inflammatory infiltrate and black arrowheads point to appendages within the newly formed dermis.

To further illustrate the variability in tissue repair, best and worst histological sections were selected from all treatment groups and compared to native skin (Figure 3.6). MT staining revealed some heterogeneity within the CFT-treated groups, where the best sections showed complete epithelial coverage (18 wounds out of 27), while the worst sections exhibited small but persistent defects and incomplete closure. Wounds treated with Jelly or Cells displayed a wider range of outcomes, from minimal ($n = 4$ wound out of 13) to partial ($n = 2$ wounds out of 13) or very poor re-epithelialization ($n = 6$ wounds out of 13). A single wound out of 13 wounds treated with Jelly or Cells was completely closed at 14 days.

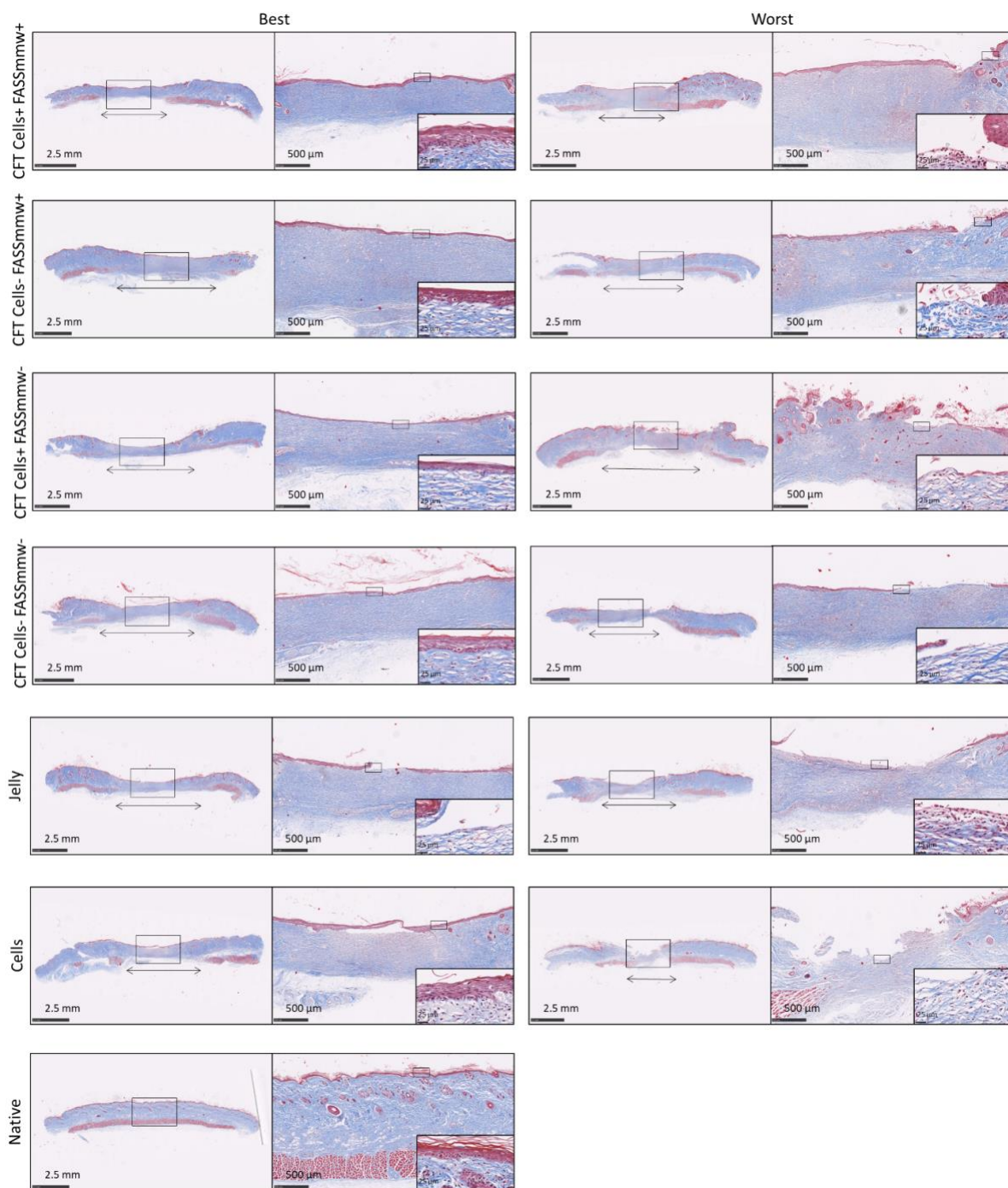


Figure 3.6 Best-worst MT-stained sections from the groups treated with Jelly and Cells and CFT-treated groups and a section from native skin. Double arrows show the wound margins and insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired.

3.4.4 Re-Epithelialization and Cornification Were Accelerated in Wounds Treated with CFT Matrix at Day 14

Histological scores revealed differences between treatment groups and native skin (Figure 3.7 and supplementary table A.4.1). Scab formation was generally absent, with the exception of one case in the Jelly group. All treated wounds exhibited a higher degree of inflammation compared to native skin, where no inflammatory infiltrates were observed. Extracellular matrix deposition was evident in all groups; however, the fibers lacked the organized bundle architecture characteristic of native tissue. Remodeling was limited, as indicated by the quasi-absence of skin appendages such as hair follicles and sebaceous glands and the scarcity of white adipose tissue in the regenerated dermis. In the Jelly- and Cells-treated wounds, only one sample out of thirteen reached complete epidermal coverage, and overall these groups showed the lowest epithelialization and cornification scores. Importantly, complete wound closure was achieved in many wounds of the CFT-treated groups, whereas closure was mostly absent in the Jelly and Cells groups. As a result, the Jelly and Cells conditions obtained the poorest histological scores, while CFT treatments, with or without cells and/or FASSmmw, consistently promoted epithelial migration, wound coverage by neo-epidermis, and clear keratin deposition.

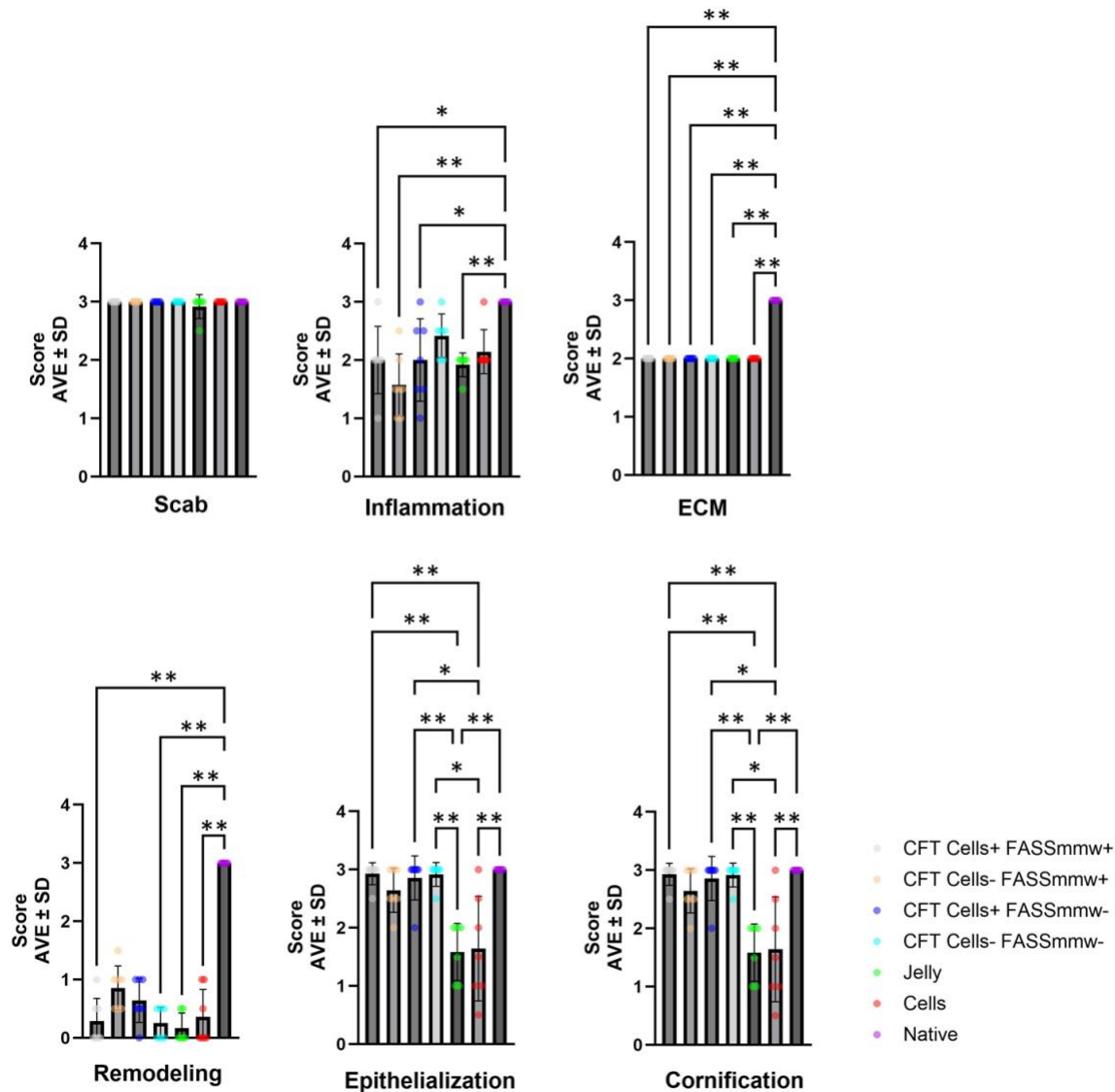


Figure 3.7 Histological scores for the different treatment groups compared to native skin. Each data point represents a single wound, and all graphs display average values $\pm$ SD. $n = 6$ or 7 wounds per group. * $p < 0.1$ and ** $p < 0.05$.

3.4.5 Increased Vascularization was Found in the Granulation Tissue of Jelly and Cells Groups at Day 14; CD68 expression was increased in all groups compared to native skin

Immunohistochemical staining for CD31 revealed clear differences in vascularization across groups (Figure 3.8). Native skin displayed only sparse CD31-positive structures, consistent with normal physiological vascularization. In contrast, all treated wounds showed elevated CD31

staining, with the Jelly and Cells groups exhibiting the highest density of CD31-positive vessels. Quantitative analysis confirmed that vascularization in Jelly and Cells was significantly greater than in the CFT-treated groups and native skin.

Cells expressing neutrophil elastase and arginase-1 (M2 macrophages) were occasionally observed within the granulation repair tissues of treated wounds (Figure A.4.1). CD68 expression (pan-macrophage marker) was higher in all treated wounds compared to native skin, but varied greatly between samples (Figure A.4.1 and Figure 3.9). In native skin, neutrophil elastase was usually situated within blood vessels, arginase-1 was associated with hair follicles and CD68 was present throughout the dermis (Figure A.4.1).

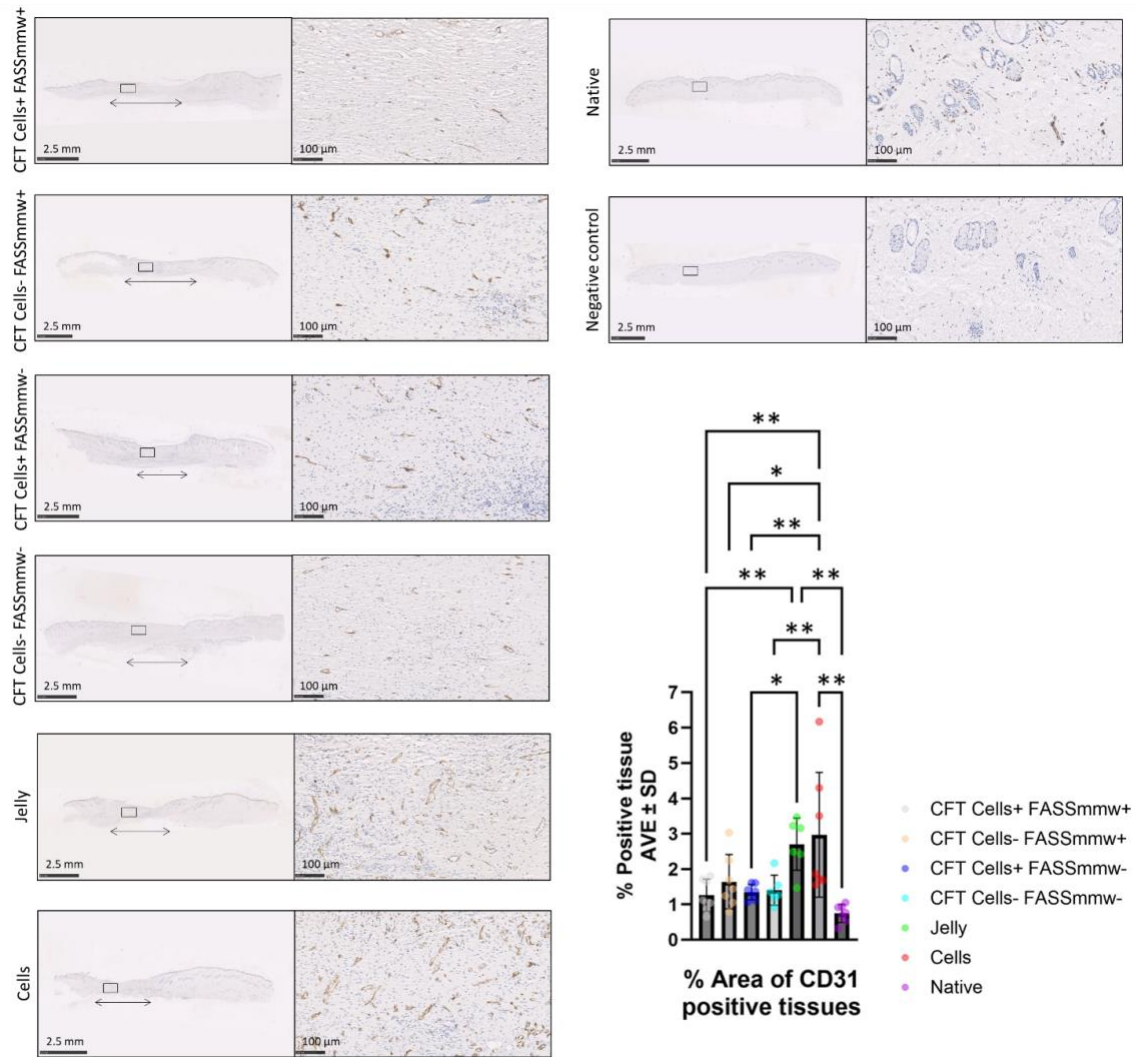


Figure 3.8 CD31-immunostained sections from the different treatment groups. Double arrows show the wound margins and insets in low magnification images show where the higher

magnification images were acquired. % Area of CD31-positive tissues is shown in the graph. n = 6 or 7 per group. * $p < 0.1$ and ** $p < 0.05$.

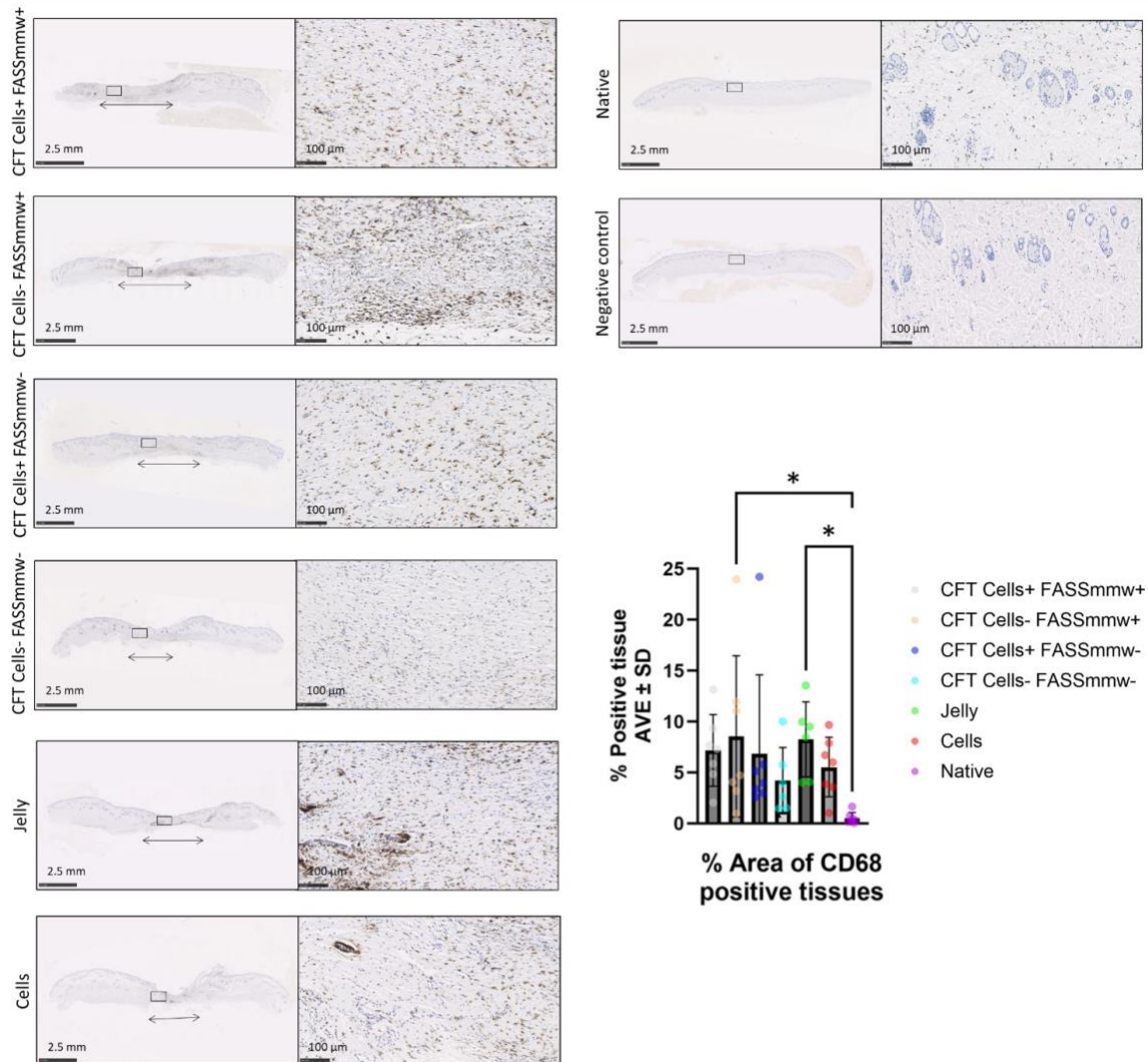


Figure 3.9 CD68-immunostained sections from the different treatment groups. Double arrows show the wound margins and insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. % Area of CD68-positive tissues is shown in the graph. n = 6 or 7 per group. * $p < 0.1$.

3.4.6 Collagen Maturation was Incomplete in All Groups at Day 14

Picrosirius red staining under polarized light revealed differences in collagen organization compared to native (Figure 3.10). Immature collagen, identified by green birefringence, was more abundant in all wounds compared to native skin, where mature yellow-red fibers predominated. Quantitative analysis confirmed that native skin exhibited higher levels of mature to immature collagen relative to treatment groups. The predominance of green fibers highlights the persistence of immature collagen in all treated conditions, underscoring the incomplete remodeling process compared to native tissue.

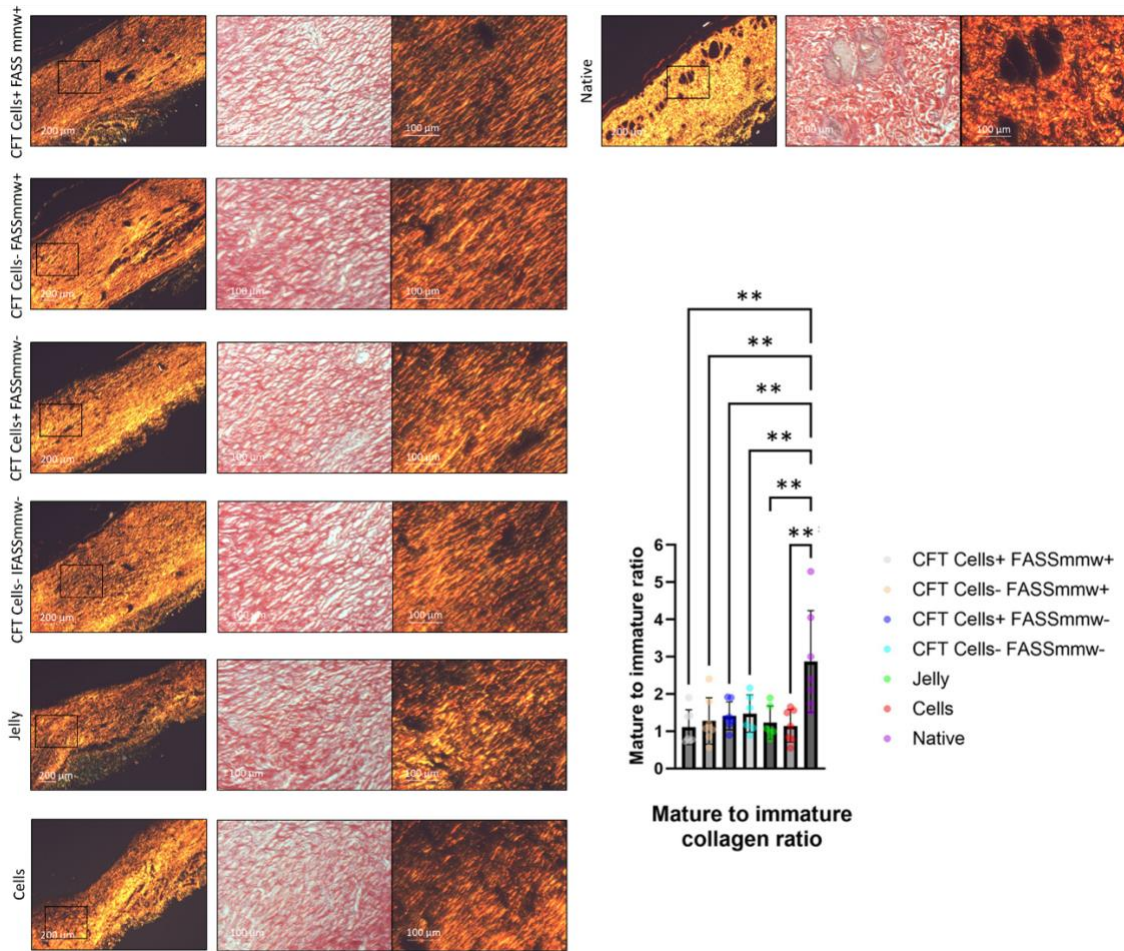


Figure 3.10 Picrosirius red-stained sections from the different treatment groups. Insets in low magnification images show where the higher magnification images were acquired. Ratio of mature to immature collagen is shown in the graph. $n = 6$ or 7 per group. ** $p < 0.05$.

3.4.7 Mechanical Properties were Similar to Native Skin in All Groups

Mechanical testing revealed comparable outcomes across all treatment groups and native skin (Figure 3.11). Wound thickness was similar among the conditions, with values clustering around those measured in native tissue. The force at 10% depth also did not differ significantly between groups, indicating that resistance to indentation was largely consistent. Overall, these results demonstrate that the mechanical properties of the repaired wounds converged toward native skin

values, without notable distinctions between CFT-treated, Jelly, Cells, or native groups (Figure A.4.2).

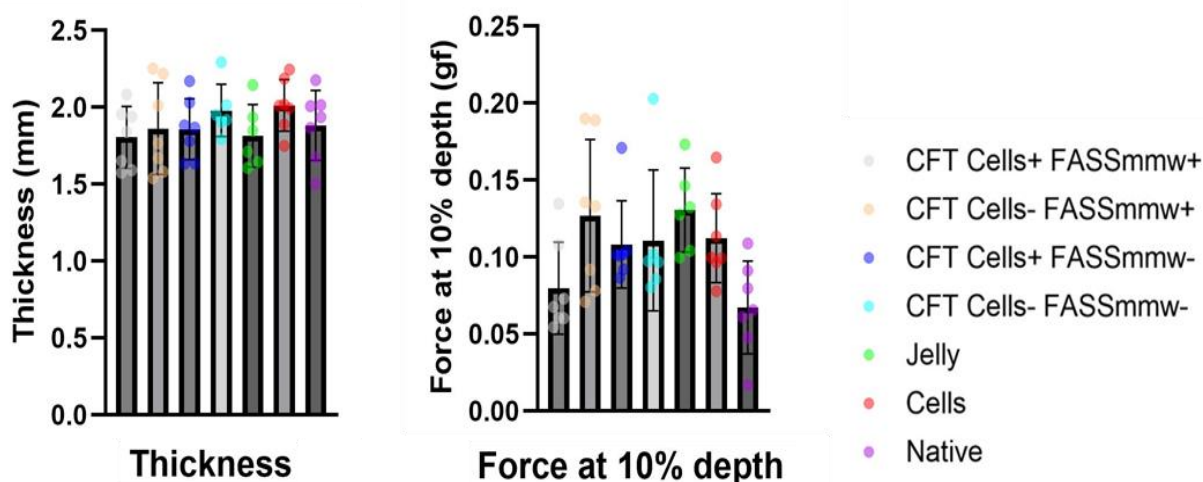


Figure 3.11 Mechanical testing data for the test article CFT Cells+ ING+ versus control groups and native skin. n = 6 or 7 per group.

3.5 Discussion

Wound healing is a multifaceted process requiring coordinated cellular, molecular, and structural events to restore the integrity and function of skin tissue. In our study, we evaluated the regenerative potential of a chitosan–fibrinogen–thrombin-based (CFT) biomaterial enriched with autologous cells and FASSmmw, comparing its performance with control formulations and native skin. The combination of biomechanical testing and histological analyses at Day 14 provides key insights into the capacity of these formulations to support functional skin regeneration. Our data do not support our starting hypothesis that an implant composed of chitosan, thrombin, fibrinogen, FASSmmw, and autologous skin cells, can improve local autologous cell viability, thereby accelerating the wound healing process. Indeed, the CFT Cells+ FASSmmw+ group was not superior to other CFT matrix-treated groups, but all CFT groups were superior to the Jelly and Cells groups.

At Day 14, all wounds treated with biomaterial or control formulations remained in an active repair phase, whereas native skin showed quiescent morphology with complete epithelialization and mature tissue organization. Our findings suggest that the CFT matrix itself, rather than the presence

of autologous cells or FASSmmw, played the central role in promoting re-epithelialization. The CFT layer appeared to form a compact, crust-like protective barrier similar to that reported for chitosan-based hydrogels, which adhered closely to the wound surface (Ishihara et al., 2001; Ribeiro et al., 2009). Several studies have shown that chitosan matrices provide a temporary scaffold that supports the migration of keratinocytes and fibroblasts from the wound edges beneath the biomaterial rather than across its surface (Concha et al., 2018; Miguel et al., 2014). This behavior is consistent with our histological observations, where epithelial cells appeared to migrate underneath the CFT matrix, suggesting that the biomaterial acted as a physical cover facilitating guided epithelial advance. Consequently, the conventional wound closure quantification could not be applied in the current study, as the opaque crust masked the underlying tissue and prevented direct surface measurement. These results also indicate that the delivered autologous cells may have not survived within the dense fibrin–chitosan network, as reported in similar crosslinked systems where limited oxygen and nutrient diffusion compromise cell viability (H. Chen et al., 2018; Wu et al., 2018). Moreover, the contribution of FASSmmw to healing remains uncertain, as no clear difference was observed between formulations containing or lacking it. Overall, these findings support the idea that the CFT matrix primarily exerts its therapeutic effect by forming a transient, biocompatible barrier that promotes endogenous keratinocyte migration from surrounding skin rather than through direct cellular contribution from the implanted material.

At Day 14, all wounds still exhibited inflammatory infiltrates and abundant deposition of unorganized extracellular matrix with low remodeling scores, reflecting an early stage of healing where the inflammatory and proliferative phases naturally overlap. This outcome is also consistent with the biological behavior of chitosan-based biomaterials. Chitosan is known to attract inflammatory cells such as macrophages and neutrophils, which play an active role in its degradation through the secretion of enzymes such as lysozyme (S. Kim, 2018; Ravindranathan et al., 2016). The transient inflammation observed in all CFT-treated wounds is therefore expected and physiologically necessary, as these immune cells contribute to the gradual resorption of the biomaterial and to the release of bioactive factors that support subsequent tissue regeneration. The persistence of inflammatory infiltrates at this time point partly reflects the incomplete degradation of the chitosan component of the CFT matrix. As demonstrated by Barbosa et al., the degree of deacetylation (DDA) and the molecular weight (M_n) of chitosan directly influence its biodegradability and the duration of the inflammatory response: highly deacetylated and high-

molecular weight chitosans degrade more slowly, prolonging material persistence and the associated immune activity(Barbosa et al., 2010). Given that the chitosan in the CFT formulation used here had DDA 83.3% and M_n 39 kDa, the sustained inflammatory response at Day 14 is consistent with ongoing biomaterial breakdown rather than pathological irritation. Altogether, these findings explain why no significant difference was observed between the groups with and without autologous cells, the healing process at this stage is mainly governed by the intrinsic properties of the CFT scaffold and its controlled biodegradation timeline, rather than by the presence of delivered cells or FASSmmw.

Angiogenesis is a fundamental event in wound healing, as it ensures oxygen and nutrient supply and provides a structural framework for fibroblast and keratinocyte migration within the granulation tissue. During the normal healing timeline, angiogenesis rises markedly during the inflammatory and early proliferative phases to supply oxygen and nutrients to the regenerating tissue, and subsequently declines as remodeling progresses and the wound matures(Honnegowda et al., 2015). Adding to that, chitosan is known to promote angiogenesis through macrophage activation and its ability to bind and concentrate pro-angiogenic factors such as VEGF and FGF(Pramanik et al., 2024). In our study, all treated wounds displayed higher vascular densities and presence of CD68-expressing cells compared to native skin, consistent with an active granulation phase at Day 14. The Jelly and Cells groups exhibited the highest number of CD31-positive vessels, while the CFT-treated groups showed intermediate values. This pattern suggests that Jelly and Cells groups remained in the acute stage of granulation, where angiogenesis typically peaks, whereas CFT-treated wounds are transitioning toward the remodeling phase. This pronounced neovascularization indicates that the Jelly and Cells wounds remained in an earlier stage of healing, with immature granulation tissue and delayed keratinocyte migration, while the moderate angiogenic response in CFT groups reflects more advanced repair. This suggests that, in addition to promoting keratinocyte migration, the CFT matrix supports early formation and maturation of the granulation tissue.

Collagen remodeling assessed by Picrosirius red staining under polarized light revealed that native skin contained predominantly mature fibers with yellow to red birefringence, whereas all treated wounds displayed a greater proportion of immature green fibers. This pattern indicates that at Day 14, the tissue remains in an early stage of extracellular matrix organization, consistent with the

overlapping inflammatory and proliferative phases of wound healing. In vivo studies have shown that even under optimized regenerative conditions, collagen maturation typically remains incomplete a few weeks post-injury. For instance, Lee et al. demonstrated in a porcine model that wounds treated with exosomes from adipose-tissue derived stem cells combined with hyaluronic acid showed enhanced collagen type III deposition but immature fiber organization at Day 21, reflecting early remodeling activity rather than complete restoration (Lee et al., 2023). Similarly, Song et al. observed that exosome-enriched extracellular matrix hydrogels promoted dense collagen deposition and accelerated healing by Day 14 in murine models, yet the newly formed fibers exhibited immature alignment and limited crosslinking, characteristic of early granulation tissue (Song et al., 2023). These findings reinforce that, at this time point, the healing tissue has not yet achieved full collagen maturation, and the predominance of immature collagen and green birefringence reflects active fibroblast activity and ongoing ECM remodeling. Therefore, the immature collagen network observed across all treated groups aligns with the expected timeline of wound repair, where structural reorganization continues beyond the second week of healing.

Mechanical assessment at Day 14 using indentation revealed that both the force at 10% strain and tissue thickness were comparable to those of native skin, indicating an early functional recovery of suppleness and physiological resistance. This finding suggests that, despite incomplete collagen remodeling, the repaired wounds had already regained near-native biomechanical integrity. We elected here to use a non-destructive indentation testing method that preserved tissue structure for downstream analyses. However, we are aware that most published reports rely on tensile testing until rupture which provides information on load to failure.

While this study provides valuable insights into the biological and mechanical performance of the chitosan-fibrinogen-thrombin (CFT) matrix in wound repair, several limitations should be acknowledged. First, the evaluation was conducted at a single time point (Day 14), corresponding to an early stage of the healing process characterized by overlapping inflammatory and proliferative phases. As a result, the long-term remodeling and full collagen maturation phases could not be assessed, limiting the interpretation of sustained tissue regeneration and mechanical stability over time. Second, the survival and contribution of the delivered autologous cells within the dense chitosan-fibrin network remain uncertain, as no viability assays or lineage tracking were performed. Future studies combining live-cell imaging or molecular markers of cell fate could

clarify this aspect. In addition, the release kinetics of FASSmmw and its bioactivity *in vivo* were not directly quantified, preventing a clear assessment of its role in modulating inflammation or angiogenesis. Lastly, the study was conducted in a rodent wound model with inherent differences from human skin in terms of thickness, contraction, and healing dynamics; thus, extrapolation to clinical settings should be approached with caution. Despite these limitations, the results provide strong evidence that the CFT matrix promotes an organized and balanced repair response, laying the groundwork for future investigations at later time points and in more clinically relevant models.

Contrary to our initial hypothesis, the inclusion of autologous skin cells and FASSmmw did not produce a marked improvement in wound healing compared to the CFT matrix alone. Instead, our results demonstrate that the CFT scaffold itself played the dominant role in promoting wound repair by forming a biocompatible protective barrier that supported keratinocyte migration from the wound edges and granulation tissue deposition and maturation throughout the early healing phase. Overall, these findings highlight that the therapeutic benefit observed derived primarily from the intrinsic physicochemical properties of the CFT system, particularly its capacity to provide a favorable microenvironment for endogenous cell migration, rather than from the addition of external biological agents.

3.6 Author contributions

HL and AC performed the surgeries and all related analyses. HL, AC and ML interpreted the data. HL wrote the original draft. AC and ML edited the original draft. All authors read and approved the final manuscript.

3.7 Acknowledgements

We would like to acknowledge the help of Dong Wang for the production and characterization of the chitosans used in this study. This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)/Alliance program (Grant # 3101621) and by Prima Quebec (Grant # R21-46-004).

3.8 Competing interests

AC and ML are shareholders of ChitogenX Inc.

3.9 Data availability

The original contributions presented in the study are included in the article and supplementary sections. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

CHAPITRE 4 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

4.1 Synthèse générale

Ce projet de maîtrise s'inscrit dans le domaine de la médecine régénérative et visait à évaluer l'efficacité d'un implant biomatériau à base de chitosane, fibrinogène et thrombine (CFT), enrichi en cellules cutanées autologues et en sel d'acide gras FASSmmw, pour favoriser la régénération cutanée. L'objectif principal était de déterminer si l'ajout de ces composantes pouvait améliorer la viabilité cellulaire locale et accélérer la cicatrisation.

Pour ce faire, un modèle de plaie par excision dorsale chez le rat a été utilisé afin de comparer six conditions expérimentales : matrices CFT avec ou sans cellules et/ou FASSmmw, une suspension cellulaire seule, et un gel lubrifiant (témoins). Les plaies ont été évaluées au jour 14 à l'aide de tests mécaniques non destructifs (Mach-1) et d'analyses histologiques et immunohistochimiques (H&E, Masson, Picrosirius Red, CD31, Neutrophil elastase, Arginase-1, CD68).

Les résultats ont montré que la matrice CFT, indépendamment de la présence de cellules ou de FASSmmw, a favorisé une réépithélialisation accélérée et une organisation tissulaire plus homogène comparativement aux témoins. La matrice a formé une barrière protectrice compacte, facilitant la migration des kératinocytes sous sa surface et soutenant la formation d'un tissu de granulation bien structuré. Les plaies traitées ont présenté une inflammation transitoire, un collagène encore immature, mais une résistance mécanique comparable à la peau native, suggérant une récupération fonctionnelle précoce.

Cette étude a ainsi confirmé que le principal effet thérapeutique découle des propriétés intrinsèques du chitosane-fibrinogène-thrombine, plutôt que de l'ajout de cellules ou de FASSmmw. Le CFT agit comme un échafaudage bioactif capable de guider la régénération endogène, faisant de cet implant une plateforme prometteuse pour le développement futur de pansements bioactifs et d'implants régénératifs destinés au traitement des plaies cutanées complexes.

Comparativement au processus physiologique normal de cicatrisation cutanée, les résultats obtenus mettent en évidence à la fois des similarités et des différences dans la dynamique de réparation observée. Comme dans une cicatrisation non perturbée, les plaies traitées présentent une progression coordonnée de la réépithélialisation, de la formation du tissu de granulation et de la

néovascularisation. Toutefois, certaines étapes clés du remodelage, notamment la maturation complète du collagène et la restauration d'une architecture dermique pleinement organisée, demeurent incomplètes au jour 14, traduisant un décalage temporel par rapport à la guérison physiologique complète. Ces observations suggèrent que la matrice CFT favorise efficacement les phases précoces de la cicatrisation, tout en soulignant que des temps d'évaluation plus longs seraient nécessaires pour caractériser pleinement les étapes tardives du remodelage cutané.

Ce travail apporte plusieurs contributions originales au domaine de la cicatrisation cutanée et de l'ingénierie tissulaire. Dans leur ensemble, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension du rôle des matrices biomatériaux injectables dans la modulation de l'environnement cutané et soutiennent le potentiel du système CFT comme plateforme adaptable pour le développement de stratégies de régénération cutanée.

4.2 Limites de l'étude

Notre étude présente certaines limites, principalement liées à la méthodologie expérimentale et à la portée des analyses réalisées.

Tout d'abord, l'évaluation a été effectuée à un seul point temporel (jour 14), correspondant à la phase précoce de la cicatrisation. Cette approche ne permet pas de suivre la progression complète du processus de régénération, notamment les étapes de remodelage et de maturation du tissu collagénique. L'ajout de points d'analyse à des temps plus tardifs (J21, J28, voire J56) aurait permis d'évaluer la dégradation complète du biomatériau, la stabilisation mécanique du tissu et la formation d'un épiderme fonctionnel.

Une autre limite concerne la viabilité des cellules autologues incluses dans le réseau dense de chitosane et de fibrine. Aucune analyse directe (tests de viabilité, marquages spécifiques ou suivi cellulaire) n'a été effectuée pour confirmer la survie et l'intégration des cellules après implantation. Il est donc difficile de déterminer leur contribution réelle au processus de réparation. De même, la libération et l'activité *in vivo* du sel d'acide gras (FASSmmw) n'ont pas

été quantifiées, ce qui limite l'interprétation de son rôle potentiel dans la modulation de l'inflammation ou de l'angiogenèse.

Enfin, les limites du modèle animal doivent être soulignées. Le modèle de plaie par excision dorsale chez le rat est un modèle standardisé, mais il diffère du contexte humain par la rapidité de la contraction cutanée, la densité des follicules pileux et la cinétique de la réponse inflammatoire. Ces différences rendent la transposition directe des résultats à la clinique humaine prudente (Zhou et al., 2019).

Malgré ces limites, cette étude a permis de démontrer la faisabilité et la biocompatibilité du système CFT et de poser les bases méthodologiques pour de futures investigations à long terme visant à optimiser la formulation et à évaluer son efficacité dans des modèles plus proches de la physiologie humaine.

4.3 Améliorations futures

Pour approfondir les résultats obtenus dans cette étude, plusieurs pistes de recherche pourraient être envisagées.

Tout d'abord, il serait pertinent d'évaluer l'effet dose-dépendant de l'ajout du sel d'acide gras (FASSmmw) et de la densité cellulaire autologue dans la matrice CFT, afin de déterminer les concentrations optimales favorisant la régénération cutanée.

De même, des études longitudinales permettraient d'analyser la cinétique de dégradation du biomatériau et la maturation tissulaire à plus long terme, en suivant l'évolution des plaies au-delà de 14 jours, notamment jusqu'à la phase de remodelage du collagène.

Il serait également intéressant d'examiner la viabilité et la contribution réelle des cellules autologues intégrées dans la matrice à l'aide de techniques de suivi cellulaire (imagerie en fluorescence ou marquage génétique), ainsi que les interactions moléculaires entre le chitosane, le fibrinogène et FASSmmw afin de mieux comprendre leurs effets synergiques sur l'inflammation et l'angiogenèse.

Bien que le chitosane soit largement reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes intrinsèques, cet aspect n'a pas été évalué dans le cadre du présent travail. Une telle caractérisation permettrait de mieux définir le potentiel thérapeutique global de la matrice CFT et de déterminer dans quelle mesure ses propriétés antimicrobiennes pourraient contribuer, en complément de ses effets régénératifs, à améliorer la prise en charge des plaies à risque infectieux.

Par ailleurs, la caractérisation physicochimique et biologique complète de la matrice CFT constitue une autre piste d'amélioration importante. Des analyses complémentaires, telles que l'évaluation des propriétés rhéologiques, de la stabilité de la matrice, de ses propriétés mécaniques initiales ou encore de la viabilité cellulaire *in vitro*, permettraient de mieux comprendre le comportement du biomatériau avant son application *in vivo*. Ces caractérisations contribueraient à renforcer l'interprétation des résultats obtenus et à établir des liens plus directs entre les propriétés intrinsèques du produit et les réponses biologiques observées lors de la cicatrisation.

Enfin, bien que cette étude ait permis de démontrer le potentiel régénératif du CFT, une réplique sur un modèle de plaie plus proche de la physiologie humaine serait nécessaire. L'utilisation de modèles animaux de plus grande taille, tels que le porc ou le lapin, permettrait de valider la transposabilité clinique du dispositif et de tester différentes configurations du pansement (forme, épaisseur, porosité). Ces étapes seront essentielles avant d'envisager un développement préclinique élargi et l'optimisation du CFT comme implant régénératif personnalisable pour la cicatrisation des plaies complexes.

RÉFÉRENCES

- Akhtari, N., Ahmadi, M., Kiani Doust Vaghe, Y., Asadian, E., Behzad, S., Vatanpour, H., & Ghorbani-Bidkorpeh, F. (2024). Natural agents as wound-healing promoters. *Inflammopharmacology*, 32(1), 101–125. <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01318-6>
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., & Acosta, N. (2021). *Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications*.
- Azari, Z., Nazarnezhad, S., Webster, T. J., Hoseini, S. J., Brouki Milan, P., Baino, F., & Kargozar, S. (2022). Stem CELL-MEDIATED angiogenesis in skin tissue engineering and wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 30(4), 421–435. <https://doi.org/10.1111/wrr.13033>
- Barbosa, J. N., Amaral, I. F., Águas, A. P., & Barbosa, M. A. (2010). Evaluation of the effect of the degree of acetylation on the inflammatory response to 3D porous chitosan scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93A(1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32499>
- Bayer, I. S. (2022). *Advances in Fibrin-Based Materials in Wound Repair: A Review*.
- Cardoso, C. R. B., Souza, M. A., Ferro, E. A. V., Favoreto, S., & Pena, J. D. O. (2004). Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 12(2), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.012216.x>

- Chambers, R. C., Dabbagh, K., Meanulty, R. J., Gray, A. J., Blanc-Brude, O. P., & Laurent, G. J. (1998). *Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor.*
- Chen, H., Cheng, J., Ran, L., Yu, K., Lu, B., Lan, G., Dai, F., & Lu, F. (2018). An injectable self-healing hydrogel with adhesive and antibacterial properties effectively promotes wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 201, 522–531. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.090>
- Chen, Q., Qi, Y., Jiang, Y., Quan, W., Luo, H., Wu, K., Li, S., & Ouyang, Q. (2022). Progress in Research of Chitosan Chemical Modification Technologies and Their Applications. *Mar. Drugs*.
- Chermnykh, E. S., Kiseleva, E. V., Rogovaya, O. S., Rippa, A. L., Vasiliev, A. V., & Vorotelyak, E. A. (2018). *Tissue-engineered biological dressing accelerates skin wound healing in mice via formation of provisional connective tissue.*
- Chevrier, A., Hurtig, M. B., & Lavertu, M. (2021). Chitosan–Platelet-Rich Plasma Implants Improve Rotator Cuff Repair in a Large Animal Model: Pivotal Study. *Pharmaceutics*, 13(11), 1955. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111955>
- Chevrier, A., & Lavertu, M. (2025). Impact of BMI and PRP Platelet and Red Blood Cell Content on the Coagulation Kinetics of Ortho-R/PRP Mixtures. *Polymers*, 17(11), 1515. <https://doi.org/10.3390/polym17111515>
- Concha, M., Vidal, A., Giacaman, A., Ojeda, J., Pavicic, F., Oyarzun-Ampuero, F. A., Torres, C., Cabrera, M., Moreno-Villoslada, I., & Orellana, S. L. (2018). Aerogels made of chitosan and chondroitin sulfate at high degree of neutralization: Biological properties toward

- wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(6), 2464–2471. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34038>
- de Szalay, S., & Wertz, P. W. (2023). Protective Barriers Provided by the Epidermis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3145. <https://doi.org/10.3390/ijms24043145>
- Delvaux, M., Chevrier, A., Sim, S., Quenneville, É., Hurtig, M. B., De Crescenzo, G., & Lavertu, M. (2025). Chitosan/Platelet-Rich Plasma Implants in an Ovine Arthroscopic Model of Meniscus Repair. *Journal of Orthopaedic Research*, 43(10), 1875–1886. <https://doi.org/10.1002/jor.70014>
- Dieckmann, C., Renner, R., Milkova, L., & Simon, J. C. (2010). *Regenerative medicine in dermatology: Biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond*.
- Drew, A. F., Liu, H., Davidson, J. M., Daugherty, C. C., & Degen, J. L. (2001). *Wound-healing defects in mice lacking fibrinogen*.
- Dunn, L., Prosser, H. C. G., Tan, J. T. M., Vanags, L. Z., Ng, M. K. C., & Bursill, C. A. (2013). Murine Model of Wound Healing. *Journal of Visualized Experiments*.
- Dwivedi, G., Chevrier, A., Hoemann, C. D., & Buschmann, M. D. (2019). 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*, 13(4), 599–611. <https://doi.org/10.1002/term.2814>
- Falanga, V., Isseroff, R. R., Soulika, A. M., Romanelli, M., Margolis, D., Kapp, S., Granick, M., & Harding, K. (2022). CHRONIC WOUNDS PRIMER. *Nature Reviews. Disease Primers*, 8(1), 50. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00377-3>

- Ge, Y., & Wang, Q. (2023). Current research on fungi in chronic wounds. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 1057766. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1057766>
- Gugerell, A., Pasteiner, W., Nürnberger, S., Kober, J., Meinl, A., Pfeifer, S., Hartinger, J., Wolbank, S., Goppelt, A., Redl, H., & Mittermayr, R. (2014). Thrombin as important factor for cutaneous wound healing: Comparison of fibrin biomatrices in vitro and in a rat excisional wound healing model. *Wound Repair and Regeneration*, 22(6), 740–748. <https://doi.org/10.1111/wrr.12234>
- Holmes, J. H., Molnar, J. A., Shupp, J. W., Hickerson, W. L., King, B. T., Foster, K. N., Cairns, B. A., & Carter, J. E. (2019). Demonstration of the safety and effectiveness of the RECELL® System combined with split-thickness meshed autografts for the reduction of donor skin to treat mixed-depth burn injuries. *Burns*, 45(4), 772–782. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.11.002>
- Honnegowda, T. M., Kumar, P., Udupa, E. G. P., Kumar, S., Kumar, U., & Rao, P. (2015). Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, 2(0), 243–249. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.165438>
- Hsu, S., & Hsieh, P. (2015). Self-assembled adult adipose-derived stem cell spheroids combined with biomaterials promote wound healing in a rat skin repair model. *Wound Repair and Regeneration*, 23(1), 57–64. <https://doi.org/10.1111/wrr.12239>
- Huang, C.-J., Pu, C.-M., Su, S.-Y., Lo, S.-L., Lee, C. H., & Yen, Y.-H. (2023). Improvement of wound healing by capsaicin through suppression of the inflammatory response and amelioration of the repair process. *Molecular Medicine Reports*, 28(2), 155. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13042>

- Ishihara, M., Ono, K., Sato, M., Nakanishi, K., Saito, Y., Yura, H., Matsui, T., Hattori, H., Fujita, M., Kikuchi, M., & Kurita, A. (2001). Acceleration of wound contraction and healing with a photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 9(6), 513–521. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2001.00513.x>
- Iv, J. H. H., Molnar, J. A., Carter, J. E., Hwang, J., Cairns, B. A., King, B. T., Smith, D. J., Cruse, C. W., Foster, K. N., Peck, M. D., Sood, R., Feldman, M. J., Jordan, M. H., Mozingo, D. W., Greenhalgh, D. G., Palmieri, T. L., Griswold, J. A., Dissanaik, S., & Hickerson, W. L. (2018). *A Comparative Study of the ReCell® Device and Autologous Split-Thickness Meshed Skin Graft in the Treatment of Acute Burn Injuries*. 39(5).
- Jiang, T., Li, Q., Qiu, J., Chen, J., Du, S., Xu, X., Wu, Z., Yang, X., Chen, Z., & Chen, T. (2022). Nanobiotechnology: Applications in Chronic Wound Healing. *International Journal of Nanomedicine*.
- Kim, S. (2018). Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. *International Journal of Polymer Science*, 2018(1), 1708172. <https://doi.org/10.1155/2018/1708172>
- Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Raziyeva, K., Tabyldiyeva, L., Berikova, K., Zhumagul, D., Temirkhanova, K., & Saparov, A. (2023). Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration. *Pharmaceutics*, 15(3), 807. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030807>
- Kolimi, P., Narala, S., Nyavanandi, D., Youssef, A. A. A., & Dudhipala, N. (2022). Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*, 11(15), 2439. <https://doi.org/10.3390/cells11152439>

- Konno, M., Hamabe, A., Hasegawa, S., Ogawa, H., Fukusumi, T., Nishikawa, S., Ohta, K., Kano, Y., Ozaki, M., Noguchi, Y., Sakai, D., Kudoh, T., Kawamoto, K., Eguchi, H., Satoh, T., Tanemura, M., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., & Ishii, H. (2013). Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Development, Growth & Differentiation*, 55(3), 309–318. <https://doi.org/10.1111/dgd.12049>
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., & Martino, M. M. (2018). Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Advances in Wound Care*, 7(7), 209–231. <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0761>
- Lee, J. H., Won, Y. J., Kim, H., Choi, M., Lee, E., Ryoo, B., Lee, S.-G., & Cho, B. S. (2023). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Wound Healing and Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10434. <https://doi.org/10.3390/ijms241310434>
- Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161. <https://doi.org/10.1039/c4tb00027g>
- Lu, H., Oh, H. H., Kawazoe, N., Yamagishi, K., & Chen, G. (2012). PLLA–collagen and PLLA–gelatin hybrid scaffolds with funnel-like porous structure for skin tissue engineering. *Science and Technology of Advanced Materials*, 13(6), 064210. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/13/6/064210>
- Mahajan, N., Soker, S., & Murphy, S. V. (2024). Regenerative Medicine Approaches for Skin Wound Healing: From Allografts to Engineered Skin Substitutes. *Current Transplantation Reports*.

- Mamun, A. A., Shao, C., Geng, P., Wang, S., & Xiao, J. (2024). Recent advances in molecular mechanisms of skin wound healing and its treatments. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1395479. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1395479>
- Marfia, G., Navone, S. E., Di Vito, C., Ughi, N., Tabano, S., Miozzo, M., Tremolada, C., Bolla, G., Crotti, C., Ingegnoli, F., Rampini, P., Riboni, L., Gualtierotti, R., & Campanella, R. (2015). Mesenchymal stem cells: Potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis*, *11*(4), 183–206. <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1126018>
- Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Brancal, H., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2014). Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydrate Polymers*, *111*, 366–373. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.093>
- Miron, A., Giurcaneanu, C., Mihai, M. M., Beiu, C., Voiculescu, V. M., Popescu, M. N., Soare, E., & Popa, L. G. (2023). Antimicrobial Biomaterials for Chronic Wound Care. *Pharmaceutics*, *15*(6), 1606. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061606>
- Mogford, J. E., Tawil, B., Jia, S., & Mustoe, T. A. (2009). Fibrin sealant combined with fibroblasts and platelet-derived growth factor enhance wound healing in excisional wounds. *Wound Repair and Regeneration*, *17*(3), 405–410. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00481.x>
- Monteiro, I. P., Shukla, A., Marques, A. P., Reis, R. L., & Hammond, P. T. (2015). Spray-assisted layer-by-layer assembly on hyaluronic acid scaffolds for skin tissue engineering: Layer-By-Layer Assembly on Hyaluronic Acid Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Journal of*

Biomedical Materials Research Part A, 103(1), 330–340.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35178>

Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in

Rats—PMC. (n.d.). Retrieved September 18, 2025, from

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7854106/>

Ny, L., Parmer, R. J., Shen, Y., Holmberg, S., Baik, N., Bäckman, A., Broden, J., Wilczynska, M.,

Ny, T., & Miles, L. A. (2020). The plasminogen receptor, Plg-RKT, plays a role in inflammation and fibrinolysis during cutaneous wound healing in mice. *Cell Death & Disease*, 11(12), 1054. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03230-1>

Disease, 11(12), 1054. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03230-1>

Ojeh, N., Pastar, I., Tomic-Canic, M., & Stojadinovic, O. (2015). Stem Cells in Skin Regeneration,

Wound Healing, and Their Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25476–25501. <https://doi.org/10.3390/ijms161025476>

Ongenaes, K. C., Phillips, T. J., & Park, H.-Y. (2001). *Level of Fibronectin mRNA Is Markedly*

Increased in Human Chronic Wounds.

Outcomes and Characteristics of Wound Healing in an Outpatient Physical Therapy Clinic. (2020,

February 6). HMP Global Learning Network.

<https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/wounds/article/outcomes-and-characteristics-wound-healing-outpatient-physical-therapy-clinic>

Pensalfini, M., & Tepole, A. B. (2023). Mechano-biological and bio-mechanical pathways in

cutaneous wound healing. *PLOS Computational Biology*, 19(3), e1010902.

<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010902>

- Percival, N. J. (2002). Classification of Wounds and their Management. *Surgery (Oxford)*, 20(5), 114–117. <https://doi.org/10.1383/surg.20.5.114.14626>
- Pramanik, S., Aggarwal, A., Kadi, A., Alhomrani, M., Alamri, A. S., Alsanie, W. F., Koul, K., Deepak, A., & Bellucci, S. (2024). Chitosan alchemy: Transforming tissue engineering and wound healing. *RSC Advances*, 14(27), 19219–19256. <https://doi.org/10.1039/d4ra01594k>
- Ravindranathan, S., Koppolu, B. P., Smith, S. G., & Zaharoff, D. A. (2016). Effect of Chitosan Properties on Immunoreactivity. *Marine Drugs*, 14(5), 91. <https://doi.org/10.3390/md14050091>
- Ren, D., Yi, H., Wang, W., & Ma, X. (2005). The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of *N*-acetylation. *Carbohydrate Research*, 340(15), 2403–2410. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.07.022>
- Ribeiro Barros Cardoso, C., Aparecida Souza, M., Amália Vieira Ferro, E., Favoreto JR, S., & Deolina Oliveira Pena, J. (2004). Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 12(2), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.012216.x>
- Ribeiro, M. P., Espiga, A., Silva, D., Baptista, P., Henriques, J., Ferreira, C., Silva, J. C., Borges, J. P., Pires, E., Chaves, P., & Correia, I. J. (2009). Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 17(6), 817–824. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00538.x>

- Sarkar, S. D., Farrugia, B. L., Dargaville, T. R., & Dhara, S. (2013). Chitosan–collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(12), 3482–3492. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34660>
- Shingel, K. I., Faure, M.-P., Azoulay, L., Roberge, C., & Deckelbaum, R. J. (2008). Solid emulsion gel as a vehicle for delivery of polyunsaturated fatty acids: Implications for tissue repair, dermal angiogenesis and wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(7), 383–393. <https://doi.org/10.1002/term.101>
- Singer, A. J. (2022). Healing Mechanisms in Cutaneous Wounds: Tipping the Balance. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 28(5), 1151–1167. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2021.0114>
- Song, Y., You, Y., Xu, X., Lu, J., Huang, X., Zhang, J., Zhu, L., Hu, J., Wu, X., Xu, X., Tan, W., & Du, Y. (2023). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Biopotentiates Extracellular Matrix Hydrogels Accelerate Diabetic Wound Healing and Skin Regeneration. *Advanced Science*, 10(30), 2304023. <https://doi.org/10.1002/advs.202304023>
- Stiernberg, J., Norfleet, A. M., Redin, W. R., Warner, W. S., Fritz, R. R., & Carney, D. H. (2000). Acceleration of full-thickness wound healing in normal rats by the synthetic thrombin peptide, TP508. *Wound Repair and Regeneration*, 8(3), 204–215. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2000.00204.x>
- Sung, D. K., Chang, Y. S., Sung, S. I., Ahn, S. Y., & Park, W. S. (2019). Thrombin Preconditioning of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Accelerates Cutaneous Wound Healing by Boosting Their Biogenesis and Enriching Cargo Content.

- Thiruvoth, F. M., Mohapatra, D. P., Kumar, D., Chittoria, S. R. K., & Nandhagopal, V. (2015). Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, 2(0), 250–256. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.158851>
- Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, 12(8), 735. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
- van de Vyver, M., Boodhoo, K., Frazier, T., Hamel, K., Kopcewicz, M., Levi, B., Maartens, M., Machcinska, S., Nunez, J., Pagani, C., Rogers, E., Walendzik, K., Wisniewska, J., Gawronska-Kozak, B., & Gimble, J. M. (2021). *Histology Scoring System for Murine Cutaneous Wounds*.
- Verma, R., Kumar, S., Garg, P., & Verma, Y. K. (2023). Platelet-rich plasma: A comparative and economical therapy for wound healing and tissue regeneration. *Cell and Tissue Banking*, 24(2), 285–306. <https://doi.org/10.1007/s10561-022-10039-z>
- Wang, J. (2022). Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*.
- Wickett, R. R., & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34(10, Supplement), S98–S110. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>
- Wound Classification*. (n.d.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-67968-8.00006-9>
- Wu, Y.-Y., Jiao, Y.-P., Xiao, L.-L., Li, M.-M., Liu, H.-W., Li, S.-H., Liao, X., Chen, Y.-T., Li, J.-X., & Zhang, Y. (2018). Experimental Study on Effects of Adipose-Derived Stem Cell-

- Seeded Silk Fibroin Chitosan Film on Wound Healing of a Diabetic Rat Model. *Annals of Plastic Surgery*, 80(5), 572–580. <https://doi.org/10.1097/sap.0000000000001355>
- Xiao, T. (2020). *Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization*.
- Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2019, June 12). *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. [https://www.semanticscholar.org/paper/Anatomy%2C-Skin-\(Integument\)%2C-Epidermis-Yousef-Alhajj/44d65213997d3898f3aa7047385c003f7b79d097#citing-papers](https://www.semanticscholar.org/paper/Anatomy%2C-Skin-(Integument)%2C-Epidermis-Yousef-Alhajj/44d65213997d3898f3aa7047385c003f7b79d097#citing-papers)
- Zak, S., Trost, C. O. W., Kreiml, P., & Cordill, M. J. (2022). Accurate measurement of thin film mechanical properties using nanoindentation. *Journal of Materials Research*, 37(7), 1373–1389. <https://doi.org/10.1557/s43578-022-00541-1>
- Zaulyanov, L., & Kirsner, R. S. (2007). A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clinical Interventions in Aging*, 2(1), 93–98. <https://doi.org/10.2147/ciia.2007.2.1.93>
- Zhang, Z., Wang, S., Diao, Y., Zhang, J., & Lv, D. (2010). Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids in Health and Disease*, 9, 24. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-24>
- Zhou, S., Wang, W., Zhou, S., Zhang, G., He, J., & Li, Q. (2019). A Novel Model for Cutaneous Wound Healing and Scarring in the Rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 143(2), 468–477. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000005274>
- Zong, J., Jiang, J., Shi, P., Liu, J., Wang, W., Li, B., Zhao, T., Pan, T., Zhang, Z., Bi, L., Diao, Y., & Wang, S. (2020). Fatty acid extracts facilitate cutaneous wound healing through

activating AKT, ERK, and TGF- β /Smad3 signaling and promoting angiogenesis. *American Journal of Translational Research*, 12(2), 478–492.

Zuliani, T., Saiagh, S., Knol, A.-C., & Esbelin, J. (2013). Fetal Fibroblasts and Keratinocytes with Immunosuppressive Properties for Allogeneic Cell-Based Wound Therapy. *PLOS ONE*, 8(7).

ANNEXE

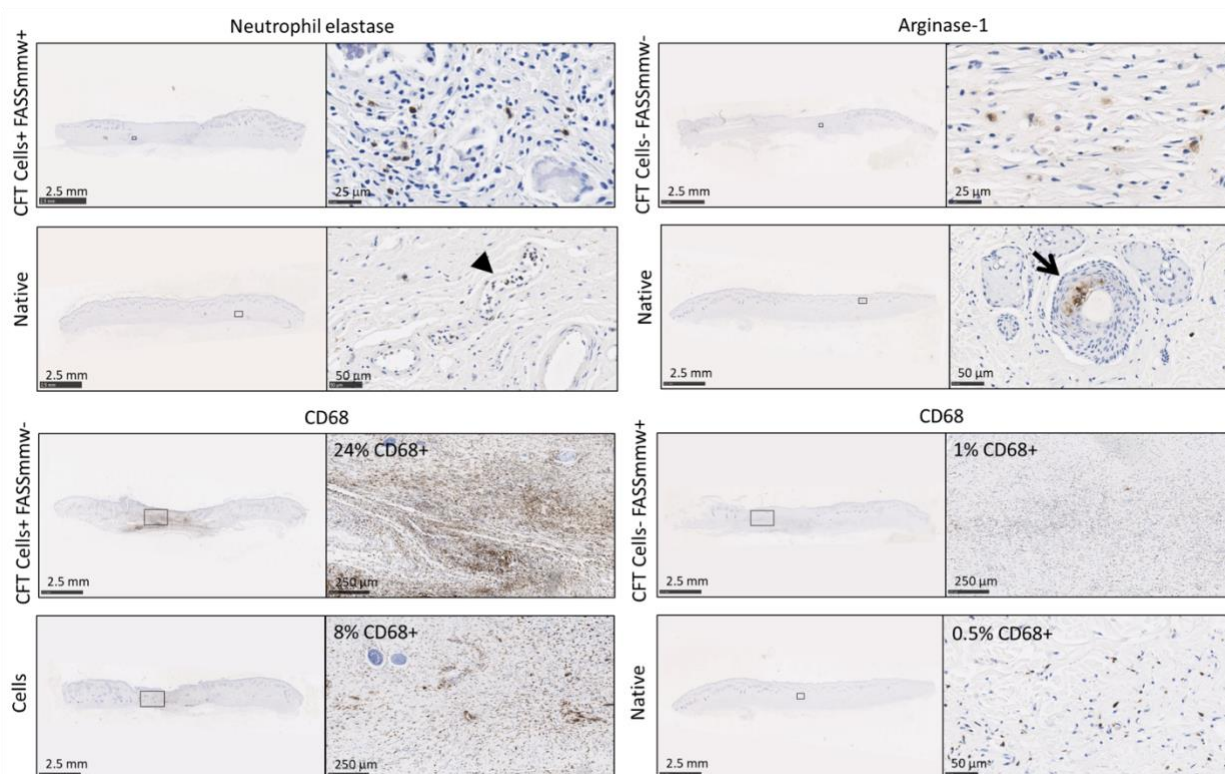


Figure A.4.1 Immunomarquage de l'élastase neutrophilique, de l'arginase-1 et du CD68. La tête de flèche noire indique un vaisseau sanguin et la flèche noire indique un follicule pileux, tous deux observés dans la peau native. Les panneaux CD68 illustrent des plaies présentant un contenu élevé, intermédiaire et faible en cellules exprimant le CD68. Les encarts dans les images à faible grossissement indiquent les zones à partir desquelles les images à plus fort grossissement ont été acquises.

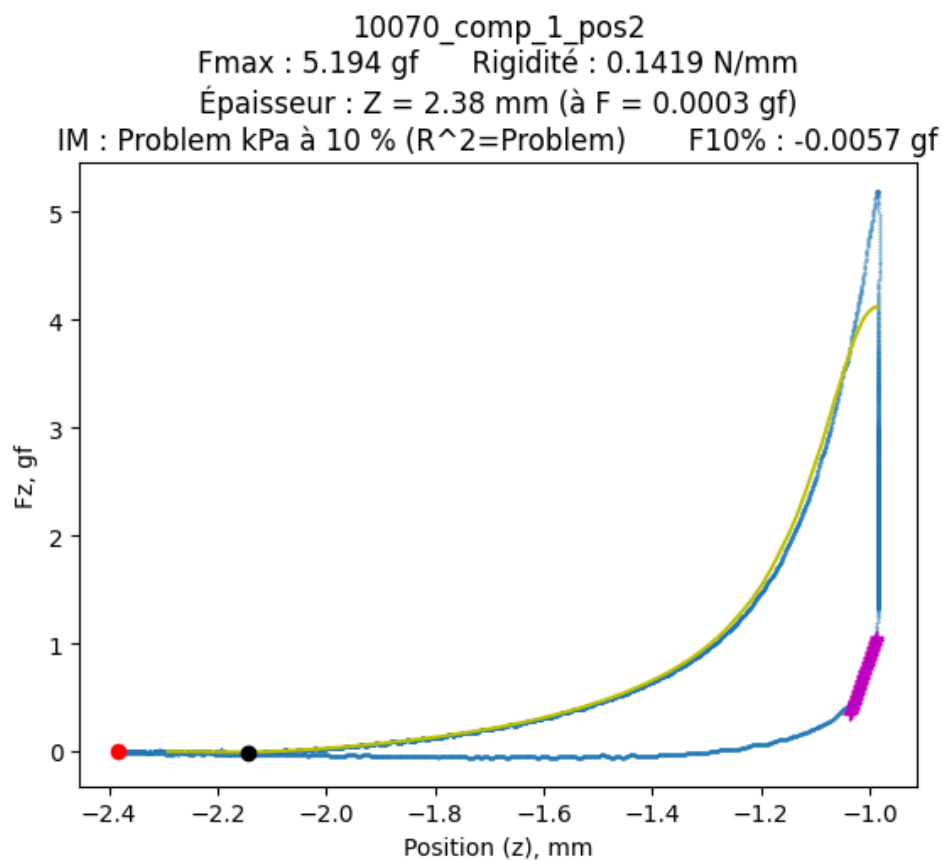


Figure A.4.2 Courbe force-déplacement représentative générée par le système d'essais mécaniques Mach-1 lors d'un test d'indentation non destructif sur un échantillon de peau. La courbe illustre l'évolution de la force normale (F_z) en fonction de la position verticale de l'indenteur (z). Les paramètres mécaniques extraits automatiquement par le logiciel, incluant la force maximale (F_{max}), la rigidité apparente et l'épaisseur locale du tissu, sont présentés à titre illustratif. Cette figure est fournie à titre d'exemple des données mécaniques brutes générées par le système Mach-1 et utilisées pour les analyses mécaniques ultérieures dans cette étude.

Discrète (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Avancée (2)	14	100	14	100	14	100	14	100	14	100	14	100	0	0
Complète (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	100
Remodelage	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Absent (0)	10	71.4	3	21.4	5	35.7	9	75.0	10	83.3	9	64.3	0	0
Discrète (1)	4	28.6	10	71.4	9	64.3	3	25.0	2	16.7	5	35.7	0	0
Avancée (2)	0	0	1	7.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Complète (3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	100
Épithélialisation	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Absent (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7.1	0	0
Discrète (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	41.7	6	42.9	0	0
Avancée (2)	1	7.1	5	35.7	2	14.3	1	8.3	7	58.3	4	28.6	0	0
Complète (3)	13	92.9	9	64.3	12	85.7	11	91.7	0	0	3	21.4	14	100
Cornification	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Absent (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7.1	0	0

Discrete (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	41.7	6	42.9	0	0
Advanced (2)	1	7.1	5	35.7	2	14.3	1	8.3	7	58.3	4	28.6	0	0
Complete (3)	13	92.9	9	64.3	12	85.7	11	91.7	0	0	3	21.4	14	100
Total	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7.1	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8.3	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	3	25.0	3	21.4	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	16.7	3	21.4	0	0

