



HAL
open science

Formulation et caractérisation d'un matériau biologiquement actif: application à la médecine régénérative du disque intervertébral

Audrey Fragale

► **To cite this version:**

Audrey Fragale. Formulation et caractérisation d'un matériau biologiquement actif: application à la médecine régénérative du disque intervertébral. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01710788

HAL Id: dumas-01710788

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01710788>

Submitted on 16 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2018 - N°12

**THÈSE pour l'obtention du
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par **Audrey FRAGALE**

Née le 3 Juin 1987 à Angoulême

Le 17 janvier 2018 à Bordeaux

**Formulation et caractérisation d'un matériau
biologiquement actif : application à la médecine
régénérative du disque intervertébral**

Directeur de thèse
Madame KAUSS Tina, Docteur

Jury : Madame CRAUSTE-MANCIET Sylvie, Professeur (Président)
Madame KAUSS Tina, Docteur
Monsieur CLOUET Johann, Docteur

REMERCIEMENTS

J'aimerais adresser mes plus sincères remerciements,

A mon Président,

***Professeur Sylvie Crauste-Manciet** je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Soyez assurée de mon profond respect.*

A mon Directeur,

***Docteur Tina Kauss**, merci d'avoir accepté de diriger ce travail. Je vous remercie pour toute l'aide que vous avez pu m'apporter durant la rédaction de ce manuscrit et les encouragements qui m'ont particulièrement touchée. Je vous remercie également pour l'enseignement à la fois chaleureux et rigoureux que vous m'avez donné durant mon cursus pharmaceutique. Vous trouverez ici l'expression de ma profonde gratitude et de toute ma reconnaissance.*

A mon jury,

***Docteur Johann Clouet**, merci de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse et de juger ce travail. Merci d'avoir dirigé mes travaux, de m'avoir guidée tout au long et d'avoir pris le temps de me transmettre votre savoir. Un grand merci pour vos qualités humaines. Vous trouverez dans cet ouvrage le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

A mon laboratoire d'accueil,

*Je tiens à remercier chaleureusement le directeur du LIOAD, le **Professeur Pierre Weiss** et le directeur de RMeS, le **Professeur Jérôme Guicheux** pour m'avoir permis d'intégrer leur équipe. Je remercie également le **Docteur Catherine Le Visage**. Merci pour vos précieux conseils, votre disponibilité sans faille, et votre joie de vivre.*

*Un immense merci à **Nina Henry**. Merci pour ta présence, ton soutien et ton esprit critique qui a contribué à alimenter ma réflexion tout au long de ce projet. Merci pour ce que tu es, c'est pour moi une vraie belle rencontre.*

Je remercie aussi toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Je pense tout particulièrement à Fahed Hached pour le temps qu'il m'a consacré et sans qui je n'aurais pu réaliser l'ensemble de mes travaux. Je remercie aussi l'ensemble du personnel du laboratoire et les étudiants avec qui tous les moments passés n'ont été que des plus agréables. Sans oublier l'Université de Nantes, l'INSERM ainsi que les financeurs (ANR, FARMA, Région Pays de la Loire, FRM).

A mes parents,

Merci de m'avoir donné l'opportunité et les moyens de faire ces belles études qui se clôturent aujourd'hui avec cette thèse.

Merci de m'avoir donné le goût de l'effort, de m'avoir guidée et soutenue dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci d'avoir résisté à toutes les épreuves que je vous ai imposées et de ne jamais avoir cessé de croire en moi. Merci d'avoir été de vrais piliers et merci pour votre présence si réconfortante. Merci d'avoir tout fait pour que ma vie soit belle et d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. J'espère que vous êtes fiers de moi, moi je le suis de vous.

JE VOUS AIME.

A ma sœur,

Parce que tu es ma petite sœur adorée, la meilleure dont j'aurais pu rêver. Merci d'être à mes côtés à chaque instant. Merci de m'avoir bousculée par moment et de m'avoir fait grandir par la même occasion. Merci pour tous ces bons moments que l'on passe ensemble et tous ceux à venir.

Je t'aime inconditionnellement.

A l'amour de ma vie,

Mon cœur,

Tu m'as soutenue, épaulée et aidée du mieux que tu pouvais le faire, et tu m'as donné tout l'amour dont j'avais besoin. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est aussi grâce à toi. Tu as été ma plus grande force pour avancer vers ce futur tant rêvé qui est enfin arrivé. Merci de partager ma vie, de m'avoir fait les plus formidables des enfants et de faire mon bonheur au quotidien.

Je t'aime plus que tout.

A mes enfants,

Louane et Nathanaël,

Vous êtes encore bien trop petits pour comprendre ce que j'écris, mais c'est à vous que je dédie ce manuscrit. Vous êtes ma joie de vivre, ma force, ma raison d'être.

Votre maman qui vous aime à la folie. 

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIÈRES	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION	15
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I. MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE	21
1. Thérapie cellulaire	21
1.1. Cellules souches pluripotentes.....	23
1.1.1. Cellules souches embryonnaires (CSE)	23
1.1.2. Cellules souches pluripotentes induites (iPS)	27
1.2. Cellules souches multipotentes.....	31
2. Ingénierie tissulaire.....	36
II. LES BIOMATÉRIAUX EN MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE	38
1. Les principales classes de biomatériaux utilisées en ingénierie tissulaire.....	39
1.1. Les métaux et alliages métalliques	39
1.2. Les céramiques.....	40
1.3. Les polymères synthétiques	41
1.4. Les matériaux d'origine naturelle	42
2. Les hydrogels comme biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire	44
2.1. L'état de gel	44
2.2. L'hydrogel.....	46
3. Les microparticules, une forme intéressante	48
3.1. Microcapsules et microsphères	48

3.2.	Les différentes méthodes d'obtention des microsphères.....	50
3.2.1.	Procédés chimiques	51
\	La polymérisation.....	51
	La polymérisation en masse	52
	La polymérisation en milieu dispersé.....	52
3.2.2.	Procédés physico-chimiques.....	53
\	L'émulsion	53
	L'émulsion simple.....	53
	L'émulsion simple suivie d'une évaporation du solvant.....	53
	L'émulsion double.....	56
\	Coacervation ou séparation de phase.....	58
\	Gélification thermique d'émulsion (Holt melt).....	59
3.2.3.	Procédés mécaniques.....	60
\	La nébulisation-séchage par atomisation (Spray drying)	60
\	Gélification ou congélation de gouttes (Prilling).....	61
3.2.4.	Choix de la méthode.....	61
III.	LA MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE DU DISQUE INTERVERTÉBRAL	62
1.	Du disque intervertébral sain au disque intervertébral dégénéré	62
2.	Des traitements conservateurs à la médecine régénérative du DIV	65
3.	L'hydrogel de pullulane appliqué à la médecine régénérative du DIV	68
3.1.	Le pullulane.....	68
3.2.	Les microsphères de pullulane par émulsion/réticulation avec le trimétaphosphate de sodium	70
4.	Stratégie élaborée pour le traitement de la dégénérescence discale.....	72
	PARTIE EXPÉRIMENTALE	75
I.	PRÉSENTATION DU PROJET EXPÉRIMENTAL - OBJECTIFS TECHNIQUES ET STRATÉGIE DE TRAVAIL.....	77

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	78
1. Matériels	78
2. Méthodes	79
2.1. Marquage du pullulane à la fluorescéine.....	79
2.2. Formulation des microsphères de pullulane	79
2.3. Séparation.....	81
\ Tamisage sur tamis en voie liquide	81
\ Tamisage sur étamine en milieu aqueux.....	81
\ Séparation en ampoule à décanter	81
\ Séparation par injection à travers une aiguille 18G.....	82
\ Séparation par aspiration.....	82
\ Filtration en transfuseur.....	83
2.4. Caractérisation des microsphères de pullulane	83
2.4.1. Morphologie macroscopique.....	83
2.4.2. Distribution de la taille	83
\ Logiciel de traitement d'image.....	83
\ Granulométrie à diffraction laser	83
2.4.3. Rendement	84
2.4.4. Taux de réticulation	84
2.4.5. Taux d'hydratation	86
2.4.6. Taux de gonflement.....	86
2.4.7. Test de résistance à la compression	87
2.5. Contrôle de l'aptitude à répondre à l'application visée	87
2.5.1. Distribution de la taille des microsphères avant et après lyophilisation en fonction du solvant d'hydratation	87
2.5.2. Association des microsphères à l'HPMC-Si et « injectabilité ».....	87
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION	88

1.	Optimisation de la formulation des microsphères de pullulane.....	88
1.1.	Influence de la vitesse d'agitation.....	89
1.2.	Influence de la quantité de pullulane dispersé.....	90
1.3.	Influence de la température, de la taille de l'agitateur et du bécher, de la quantité d'agent réticulant.....	91
2.	Optimisation de la séparation des microsphères de pullulane.....	92
\	Tamisage mécanique sur tamis inox.....	93
\	Tamisage manuel sur étamine.....	94
\	Décantation en ampoule.....	94
\	Séparation par injection avec une aiguille 18G.....	95
\	Séparation par aspiration à l'aide d'une pipette pasteur à pointe fine	95
\	Séparation en transfuseur doté d'un filtre en nylon.....	95
3.	Caractérisation des microsphères de pullulane.....	97
3.1.	Rendement.....	97
3.2.	Taux de réticulation.....	97
3.3.	Taux d'hydratation.....	100
3.4.	Taux de gonflement.....	100
3.5.	Test de résistance à la compression.....	101
4.	Aptitude à répondre à l'application visée.....	102
4.1.	Taille des microsphères en fonction du solvant de réhydratation.....	102
4.2.	Comportement des microsphères de pullulane au sein de l'HPMC-Si.....	103
	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	105
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	109
	SERMENT DE GALIEN.....	123
	ABSTRACT.....	125
	RÉSUMÉ.....

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	ADN	Acide désoxyribonucléique
	AF	<i>Annulus Fibrosus</i> → Anneau Fibreux
	ANOVA	Analyse des variances
	ANR	Agence Nationale pour la Recherche
B	BSA	Albumine de sérum bovin
	β TCP	Phosphate tricalcique béta
C	CSa	Cellule souche adulte
	CSAh	Cellule souche adipeuse humaine
	CSE	Cellule souche embryonnaire
	CSEh	Cellule souche embryonnaire humaine
	CSH	Cellule souche hématopoïétique
	CSM	Cellules souche mésenchymateuse
D	DIV	Disque intervertébral
	DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
E	E	Elasticité
	E/H	Emulsion simple eau dans huile
	E/H/E	Emulsion double eau dans huile dans eau
	EI	Efficacité d'incorporation
	ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay → Dosage immuno-enzymatique
F	FARMA	Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée
	FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
	FRM	Fondation pour la Recherche Médicale
G	G	Gauge
	GDF-5	Growth Differentiation Factor-5 → Facteur de croissance et de différenciation-5

GMP	Good Manufacturing Practice → Bonnes pratiques de fabrication
H	
HA	Hydroxyapatite
H/E	Emulsion simple huile dans eau
HEMA	Méthacrylate d'hydroxyéthyle
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipéridine éthane sulfonique
H/H	Emulsion simple huile dans huile
HLA	Human leukocyte antigen → Antigènes des leucocytes humains
HNO₃	Acide nitrique
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HPMC-Si	Hydroxypropylmethylcellulose-silanisée
H₃PO₄	Acide phosphorique
I	
IL-4	Interleukine 4
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java → Traitement d'images et analyses en Java
INFγ	Interféron gamma
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
iPS	Induce pluripotent stem cells → Cellule souche pluripotente induite
L	
LIOAD	Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire
M	
MAPC	Multipotent adult progenitor cells → Cellules progénitrices adultes multipotentes
MCI	Masse cellulaire interne
MEC	Matrice extracellulaire
MTI	Médicament de thérapie innovante
N	
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NH₄VO₃	Vanadate d'ammonium
NP	<i>Nucleus Pulposus</i> → Noyau Pulpeux
ns	Non significatif
O	
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
P	
PBS	Phosphate Buffered Salin → Tampon phosphate salin

	PGA	Acide polyglycolique
	pH	Potentiel hydrogène
	PLA	Acide polylactique
	PLGA	Acide poly(lactique-co-glycolique)
	PMBs	Pullulan microbeads → Microsphères de pullulane
	POCl₃	Oxychlorure de phosphore
Q	Q	Taux de gonflement
	qsp	Quantité suffisante pour
R	Rd	Rendement
	RMeS	Regenerative Medicine and Skeleton research lab → Laboratoire de recherche en médecine régénérative et du squelette
	rpm	Rotations par minute
S	SDS	Sodium dodécyl sulfate
	Sol	Solution
	STMP	Trimétaphosphate de sodium
T	TH	Taux d'hydratation
	T helper	Lymphocytes T auxiliaires
	Treg	Lymphocytes T régulateurs
V	v	Vitesse limite de chute
	VEGF	Vascular endothelium growth factor → Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
	v/v	Volume per volume → Volume par volume
W	w/v	Weight per volume → Masse par volume
	w/w	Weight per weight → Masse par masse

INTRODUCTION

Durant les dernières décennies, les connaissances acquises sur les cellules souches et les avancées nouvelles dans le domaine des biotechnologies ont fait de la médecine régénérative une stratégie thérapeutique de choix pour de nombreuses pathologies dont les traitements classiques ne permettent pas la guérison : maladie de Parkinson, Alzheimer, diabète, dystrophie musculaire de Duchenne... c'est notamment le cas de la dégénérescence discale. Cette pathologie, à l'origine de 40 % des lombalgies, demeure un problème majeur de santé publique (1). Les traitements actuels proposés ne permettent pas de traiter l'origine même de cette dégénérescence et ne réussissent ainsi qu'à améliorer le confort des patients en réduisant la douleur.

Ainsi, le laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD-INSERM UMR_S 791) de Nantes au sein duquel j'ai effectué mes travaux (désormais INSERM U1229, RMeS (Regenerative Medicine and Skeleton research)) concentre aujourd'hui ses efforts sur la médecine régénérative du squelette et notamment celle du disque intervertébral.

Celle-ci constitue une approche particulièrement prometteuse au regard de la physiologie discale et des processus menant à sa dégénérescence. En effet, les connaissances récemment acquises sur ces processus, qui se caractérisent par la diminution de la densité cellulaire puis une rupture de l'homéostasie discale (2,3), laissent à penser qu'une « supplémentation » cellulaire permettrait de restaurer la matrice extracellulaire (MEC) hyperhydratée et ainsi, de rétablir les fonctions discales.

Les objectifs principaux de cette équipe sont de développer des stratégies basées sur : l'utilisation de cellules régénératives associées à un biomatériau cytoprotecteur (3) et également l'utilisation de facteurs biologiques (4,5) véhiculés *in situ* afin d'induire la régénérescence du DIV. L'association de ces différents éléments permettrait alors de générer un tissu vivant fonctionnel injectable au site lésé. Une récente étude réalisée au laboratoire a montré *in vitro* que l'apport du facteur de croissance GDF-5 (Growth Differentiation Factor-5), permet d'engager la différenciation de cellules souches issues du tissu adipeux humain (CSAh) vers des cellules présentant un phénotype semblable à celui de celles présentes dans un DIV sain (6). Il est actuellement envisagé d'injecter des CSAh pré-différenciées contenues dans un hydrogel d'hydroxypropylmethylcellulose-silanisée (7)(HPMC-Si dont le laboratoire détient le brevet référencé sous le numéro WO 2005044326 A1 (8)) dans le DIV lésé. Afin de favoriser leur différenciation et leur prolifération *in situ*, le GDF-5 pourrait être vectorisé par l'intermédiaire d'un biomatériau

qui rendrait alors possible cette approche (5). Cet objectif de vectorisation de molécules actives a été celui de la thèse de Nina Henry, doctorante à l'unité. Son travail a été envisagé selon deux approches qui pourraient être à terme complémentaires. L'une consiste en la production de nanofibres de silice sur lesquelles le GDF-5 est adsorbé et l'autre au développement de microsphères de pullulane (PMBs pour pullulan microbeads) chargées en GDF-5.

C'est dans ce contexte que je me suis vu confier pour mission l'optimisation du protocole de formulation et la caractérisation des PMBs non chargées pour une application à terme comme vecteur de facteur de croissance. Les résultats de mes travaux doivent permettre aux PMBs d'être par la suite chargées en GDF-5 et injectées par voie intra-disco en association avec l'hydrogel d'HPMC-Si et les cellules souches régénératives, formant ainsi un système biphasique : PMBs/HPMC-Si.

Le présent manuscrit de thèse s'articulera en deux parties.

Dans un premier temps, une étude bibliographique permettra de détailler les différentes approches de médecine régénérative. Les cellules souches employées, les biomatériaux existants ainsi que leurs applications possibles seront développés. Les hydrogels et la forme microsphérique seront détaillés afin de justifier nos choix. Le disque intervertébral sera décrit de sa forme saine à sa forme dégénérée nous permettant d'évoquer les traitements actuels et ceux envisagés.

Dans un second temps, une partie expérimentale développera la mise au point, par émulsion/réticulation, des PMBs. Les résultats de leur caractérisation seront exposés et discutés, l'évaluation de leur aptitude à répondre à l'application visée sera réalisée. Cette seconde partie sera présentée de façon conventionnelle : les matériels et méthodes employés précéderont les résultats et leur discussion. Cette partie a été réalisée au Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD-INSERM UMR_S 791) de Nantes (désormais INSERM U1229, RMeS (Regenerative Medicine and Skeleton research)) sous l'encadrement du Docteur Johann Clouet et du Docteur Catherine Le Visage.

Enfin, une conclusion générale, portant sur l'ensemble des travaux réalisés, et des perspectives permettront de clôturer l'ensemble.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE

La médecine régénérative est un domaine de recherche multidisciplinaire. Il s'agit d'une stratégie thérapeutique qui vise à restaurer les tissus ou organes endommagés ainsi que les activités fonctionnelles en tirant profit de la capacité du corps à se régénérer et donc à produire de nouveaux tissus ou, en remplaçant les tissus malades par des tissus sains produits via l'utilisation de cellules souches. Il existe trois approches différentes : la **thérapie cellulaire**, l'**ingénierie tissulaire** et la **thérapie génique** (cette dernière ne sera pas développée dans ce manuscrit).

1. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est l'ensemble des techniques permettant la manipulation ou la transformation d'une cellule ou d'un tissu, afin de leur conférer des fonctions nouvelles, en l'occurrence thérapeutiques (9). Comme son nom l'indique, elle consiste à utiliser des cellules saines dans le but de rétablir la fonction d'un tissu ou d'un organe endommagé de manière ciblée et durable. Bien que différentes sortes de cellules soient utilisées pour obtenir des cellules différenciées fonctionnelles adaptées à la thérapie cellulaire, elles ont toutes deux propriétés communes (10):

- la possibilité de donner naissance à plusieurs types cellulaires fonctionnels, nommée **différenciation multi-lignée**,
- une capacité à se diviser physiologiquement de manière illimitée mais contrôlée, il s'agit de l'**auto-renouvellement**.

Ces deux caractéristiques font de ces cellules, des cellules dites **cellules souches**. Leur capacité de différenciation multi-lignée permet la formation de cellules fonctionnelles dans les tissus cibles, leur capacité d'auto-renouvellement assure le maintien du réservoir cellulaire et ainsi une régénération maintenue à moyen voire à long terme. Grâce au fort potentiel régénératif de ces cellules, cette approche est très prometteuse à des fins thérapeutiques. Cependant leur capacité d'auto-renouvellement illimité qu'elles partagent avec les cellules tumorales entraîne un risque de dégénérescence cellulaire et de croissance cellulaire incontrôlée, voire tumorale (11), qui doit absolument être maîtrisé et surveillé pour toute application clinique. Les cellules utilisées proviennent soit du patient lui-même, ce sont des cellules dites **autologues**, soit d'un donneur sain, on parle alors de cellules **allogéniques**. En fonction de leur potentiel de différenciation (Figure 1) ces cellules sont soit des **cellules souches pluripotentes** capables de se

différencier en tous types cellulaires y compris en cellules germinales, soit des **cellules souches multipotentes** pouvant donner un nombre limité de cellules ayant une même origine embryonnaire.

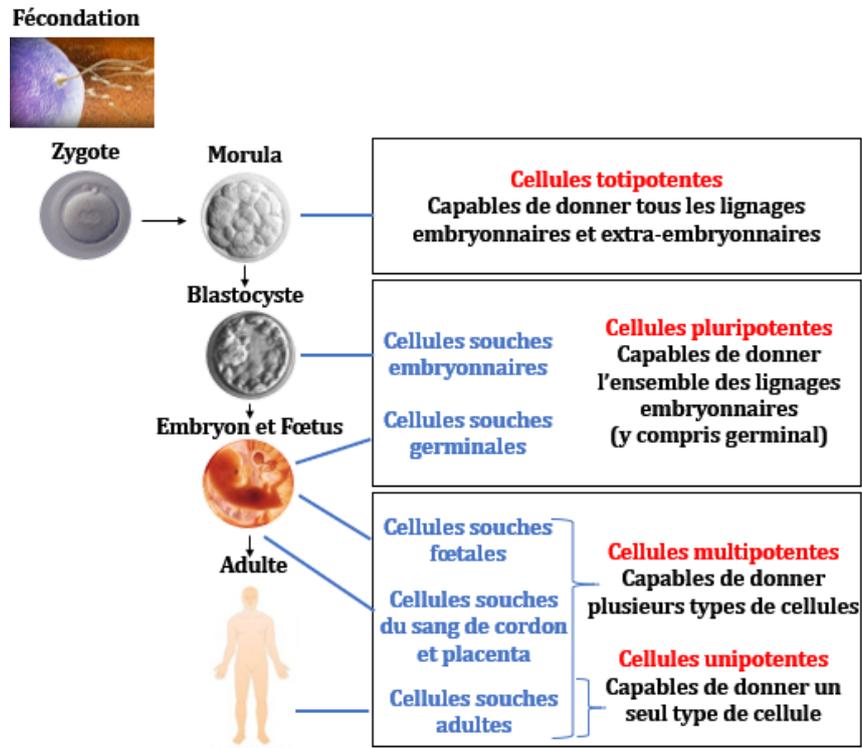


Figure 1. Ontogénèse et capacité de différenciation cellulaire (Adapté de Denis J.A., 2011 (12)).

A but thérapeutique, deux stratégies sont employées (13):

- la **thérapie cellulaire substitutive**, concerne l'implantation de cellules exogènes saines pouvant produire une substance nécessaire à l'organisme ou influencer sur son microenvironnement de façon à moduler une réponse physiologique, par exemple la réponse immunitaire.
- la **thérapie cellulaire régénérative**, consiste à utiliser des cellules souches, pouvant se différencier en cellules cibles dans le but de reconstituer un tissu ou un organe défaillant.

Hormis l'utilisation de ces cellules *in vivo* en étant implantées dans le corps des patients dans le cadre de thérapie cellulaire, elles sont également utilisées *in vitro* soit en recherche fondamentale permettant une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques (14), soit pour la recherche de nouveaux médicaments (15) en tant qu'outil pour : l'identification et la validation de cibles thérapeutiques, le criblage de nouvelles molécules ou encore l'évaluation de l'efficacité et

de la sécurité de la molécule active. Chacune de ces applications contribue à l'étude et au traitement des maladies humaines.

1.1. Cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes peuvent donner tous les types cellulaires de l'organisme, elles sont donc capables de donner tous les lignages embryonnaires y compris germinales mais pas les annexes extra-embryonnaires (16) contrairement aux cellules totipotentes. Elles sont de deux origines :

- les **cellules souches embryonnaires** (CSE) isolées du blastocyste, c'est-à-dire prélevées sur des embryons de 5 à 7 jours, sont les seules cellules pluripotentes « naturelles » (Figure 2), mais dont l'utilisation est très encadrée,
- les **cellules souches pluripotentes induites** (iPS pour Induced Pluripotent Stem cells) (17) issues de cellules somatiques prélevées chez l'adulte sont reprogrammées en cellules pluripotentes par génie génétique (Figure 3).

1.1.1. Cellules souches embryonnaires (CSE)

Le procédé qui consiste à isoler les CSE à partir de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste (Figure 2) afin d'établir une lignée cellulaire stable est appelé **dérivation**.

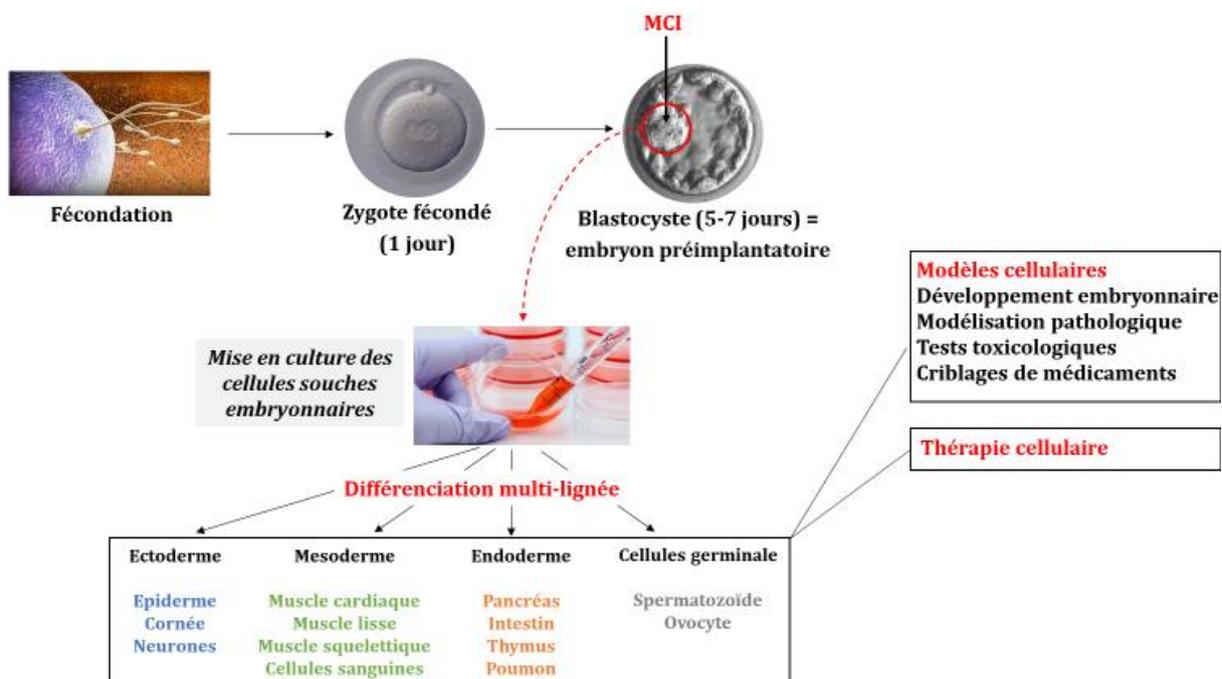


Figure 2. Développement embryonnaire : potentialité de différenciation des cellules embryonnaires issues de la masse cellulaire interne (MCI) et applications (Adapté de Aberdam D. (18)).

Ce processus a été décrit pour la première fois chez la souris en 1981, simultanément par deux équipes indépendantes : l'une britannique dirigée par Sir Martin John Evans (Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2007) et Matthew H. Kaufman à l'Université de Cambridge (19) et l'autre américaine dirigée par Gail R. Martin à l'Université de Californie à San Francisco (20). En 1998, le groupe de James A. Thomson du Genome Center of Wisconsin, à Madison aux Etats-Unis établit la première lignée de CSE humaine (CSEh) (21). A la différence des lignées de tumeurs malignes qui possèdent également une capacité d'auto-renouvellement illimité, ces cellules sont génétiquement normales et possèdent le même caryotype que celui de l'embryon dont elles sont issues (19,22). Cependant l'utilisation de ces cellules pose des problèmes éthiques, en raison de la nécessité de détruire l'embryon afin de les isoler (21,23). Des recherches sont ainsi menées afin d'obtenir ces cellules sans nécessairement détruire l'embryon parental (24-26). En France, la loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique (27) modifiant celle de 1994, permet par dérogation pour une période de cinq ans, de conduire une recherche sur l'embryon humain encadrée par l'Agence de biomédecine. Depuis la révision en 2013 (n° 2013-715 du 6 août 2013) de la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (28,29), les projets autorisés doivent répondre à plusieurs critères relatifs à leur pertinence, à l'éthique, à l'objectif d'apporter des progrès thérapeutiques majeurs et au fait de ne pouvoir être poursuivi par une méthode alternative d'efficacité comparable. En pratique ces cellules sont prélevées sur des embryons surnuméraires préimplantatoires obtenus par fécondation *in-vitro* dans le cadre d'une procréation médicalement assistée ou sont issues d'embryons congelés en prévision d'un projet parental finalement abandonné. Ceux-ci sont alors cédés gratuitement à la recherche par les parents biologiques qui donnent leur consentement écrit. Dans ce contexte, les CSEh en France ne sont utilisées qu'à des fins de recherche.

Les chercheurs savent aujourd'hui différencier les CSE en plusieurs centaines de types cellulaires, comme des cellules rétinienne, cardiaques, musculaires ou encore des cellules de la peau. Chaque type cellulaire est obtenu grâce à une combinaison de facteurs de croissance et de différenciation spécifique, dont le protocole est complexe et longue à mettre au point. La possibilité d'obtenir n'importe quel type de lignée cellulaire à partir de CSE ouvre la voie à de nouvelles découvertes tant en recherche fondamentale qu'en recherche industrielle.

En recherche fondamentale, les CSEh représentent un outil précieux pour comprendre les mécanismes responsables du développement cellulaire et tissulaire mais aussi les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation cellulaire. On peut ainsi :

- faire des recherches sur le développement cellulaire et tissulaire normal ou pathologique humain,
- mener des travaux afin d'étudier les différents stades de développement et le devenir des cellules dans l'organisme,
- étudier l'embryogénèse (30) et l'oncogénèse (31), qui trouvent des opportunités nouvelles d'analyse et d'observation via ces cellules souches qui pourraient se substituer aux modèles animaux.

En effet, il est nécessaire de modéliser un phénomène ou une maladie afin de les étudier et de comprendre les mécanismes physiologiques et physiopathologiques impliqués. Ainsi, lorsque les scientifiques étudient une maladie, ils ont recours à des modèles qui doivent être les plus représentatifs de la pathologie étudiée, dans lesquels ils peuvent tester leurs hypothèses et rechercher par exemple une cible moléculaire altérée. L'existence de lignées CSEh mutantes spontanées (embryons porteurs d'une maladie génétique détectée à l'issue d'un diagnostic pré-implantatoire lors de fécondation *in vitro*) ou artificielles (obtenues par manipulation génétique) (32–34) permet d'envisager la modélisation pathologique de nombreuses maladies génétiques (14) et ainsi de développer des méthodes pour les prévenir.

Dans l'industrie pharmaceutique, l'utilisation des CSEh s'avère utile pour découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques (15). Les CSEh offrent l'avantage de permettre l'obtention de quantités importantes de cellules affectées par une maladie donnée mais aussi une diversité infinie de modèles cellulaires (15). Au cours de l'étape de criblage, correspondant à l'identification de nouvelles molécules aux propriétés biologiquement actives, des dizaines de milliers de molécules vont être mises en contact avec le modèle cellulaire muté mimant la pathologie étudiée afin de déterminer quelles molécules permettent de normaliser la modulation pathologique. Une fois identifiée, la molécule va être optimisée lors de tests pré-cliniques réalisés chez l'animal afin d'apporter un niveau de sécurité et d'efficacité suffisant pour rentrer en phase clinique chez l'homme. Dans le contexte législatif actuel, les différentes réglementations européennes et les recommandations de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) incitent les industriels à limiter l'utilisation des animaux pour leurs études. Bien

que les modèles animaux restent majoritairement utilisés lors de cette phase, ils ne peuvent pas toujours prédire les effets qu'une molécule candidate peut avoir sur l'homme (15). Les CSEh se présentent alors comme des modèles innovants notamment en toxicologie prédictive. Capables de se différencier en hépatocytes et en cardiomyocytes, les industriels peuvent tester les effets toxiques et indésirables de la molécule sur les cellules représentatives d'organes vitaux tels que le foie et le cœur avant son utilisation chez l'homme (15) et ainsi obtenir des résultats plus sûrs avant l'autorisation de mise sur le marché.

Concernant la thérapie cellulaire, l'utilisation des CSEh se veut prometteuse pour de nombreuses pathologies notamment les maladies dégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaque, la chorée de Huntington, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), mais également pour les maladies caractérisées par un déficit cellulaire comme le diabète ou l'hépatite par exemple (35). L'utilisation de CSEh à des fins thérapeutiques répond à la réglementation des médicaments de thérapie innovante (MTI) issue du règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 (36). De ce fait, les cellules doivent répondre à un certain nombre d'exigences pour qu'elles puissent être agréées par les autorités de santé et qualifiées en « grade clinique » (37–39) afin que les essais cliniques chez l'homme puissent avoir lieu.

Comme déjà signalé auparavant la greffe directe de cellules souches pluripotentes n'est pas envisageable puisque ces cellules, une fois greffées, se différencient spontanément en une masse cellulaire composée de cellules de différentes origines embryologiques, le tératome (11,21,40) et peuvent donc être à l'origine de tumeur (41). Le prérequis pour pouvoir utiliser ces CSEh est leur différenciation guidée vers le type cellulaire d'intérêt par rapport à la pathologie à traiter (35) grâce à un protocole de différenciation approprié intégrant les normes GMP (Good Manufacture Praticce) (37–39). Par exemple, les milieux de culture doivent être dépourvus de contaminants d'origine animale et la préparation cellulaire utilisée doit être la plus pure possible (16). Ces cellules doivent également démontrer leur bonne fonctionnalité. Les deux défis majeurs sont alors de démontrer l'efficacité de la greffe (récupération fonctionnelle consécutive à l'injection des cellules d'intérêt) et de mesurer la sécurité du greffon (absence de tumeur et de réaction immunitaire). Les CSEh étant issues d'embryons, elles sont dites allogéniques. L'un des principaux obstacles à leur utilisation en phase clinique est la possibilité d'un rejet

immunitaire de ces cellules transplantées (16,35) par l'organisme receveur qui les identifient comme des agents pathogènes. Cependant le problème de la compatibilité donneur-receveur semble pouvoir être surmonté par manipulation génétique des CSEh de sorte que leur utilisation ne nécessite *a priori* qu'un traitement immunosuppresseur transitoire (35). Ce point crucial est suivi de près dans le cadre des essais cliniques en cours car si l'immunogénicité s'avèrent être plus importante que prévue cela pourrait remettre en cause leur intérêt dans un certain nombre d'indications.

Plusieurs essais cliniques utilisant ces cellules sont en cours mais pour le moment aucun traitement de thérapie cellulaire n'est autorisé en routine. Parmi ces essais, une société de biotechnologie californienne, Ocata Therapeutics, utilise des CSEh différenciées en cellules de la rétine pour lutter contre la DMLA (numéro d'essai clinique NCT02122159) (42). Une autre société américaine, Astellas Institute for Regenerative Medicine, est également en phase clinique I/II afin de tester l'efficacité et la sécurité des CSEh différenciées en cellules épithéliales pigmentaires de la rétine pour lutter contre la dystrophie maculaire de Stargardt (numéro d'essai clinique NCT01345006) (43,44). Concernant le diabète, la société américaine, ViaCyte, teste l'utilisation de cellules de pancréas productrices d'insuline encapsulées, obtenues à partir de CSEh. Ce dispositif permet à l'insuline et au glucose de diffuser, mais protège le greffon d'une réaction immune de l'hôte. (Numéros d'essais cliniques NCT02239354 et NCT03162926) (45,46). En cardiologie, une équipe de l'hôpital européen Georges Pompidou a pratiqué en octobre 2014 une greffe de cellules cardiaques dérivées de CSEh (numéro d'essai clinique NCT02057900) (47).

Bien que ces CSE soient très prometteuses pour la médecine régénérative de demain, elles restent actuellement interdites d'usage en France, sauf par dérogation à des fins de recherche, en raison de la destruction de l'embryon pour les obtenir et donc du problème éthique qui en découle. Pour contourner ce problème les chercheurs doivent alors trouver de nouvelles sources cellulaires telles que les iPS.

1.1.2. Cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Les iPS sont au même titre que les CSEh, des cellules souches pluripotentes capables d'auto-renouvellement et de différenciation multi-lignée. En revanche elles ne sont pas « naturelles » mais obtenues par **reprogrammation génétique** à partir de cellules adultes différenciées (Figure 3).

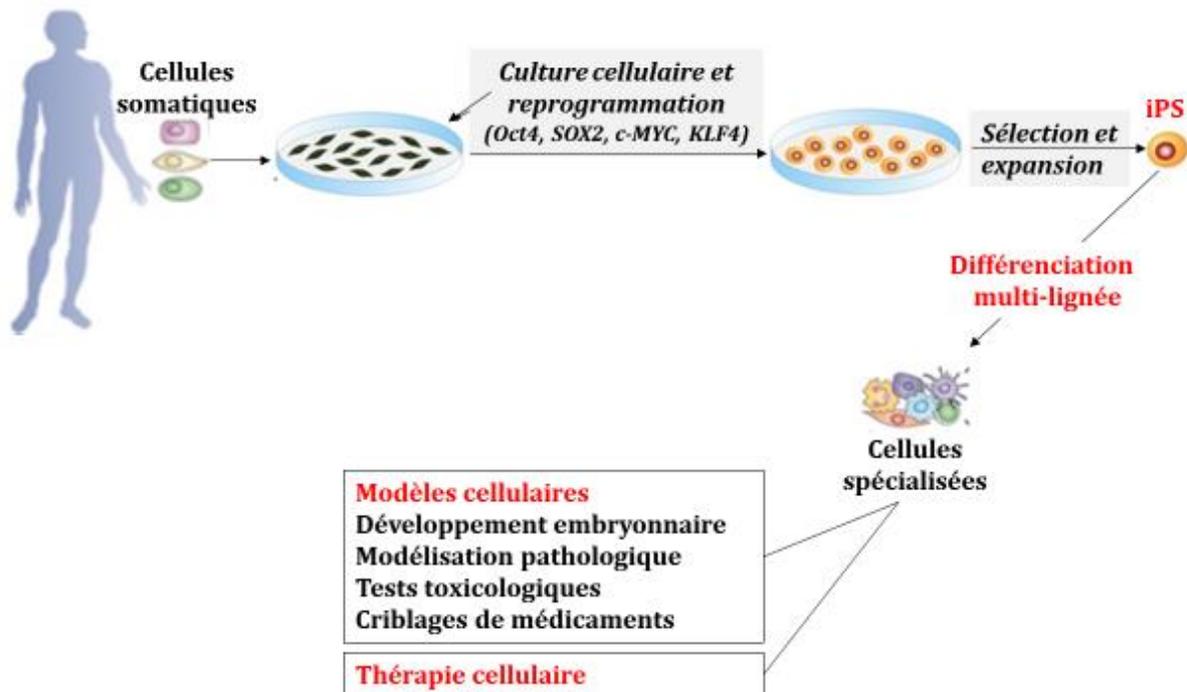


Figure 3. Obtention de cellules iPS et différenciation multi-lignée pour diverses applications (Adapté de Balajthy Z. et al., 2011 (48))

Cette reprogrammation génétique consistant à réactiver les signaux d’immaturité et de prolifération caractéristiques d’une cellule pluripotente, a été décrite pour la première fois en 2006 par les chercheurs japonais Kasutoshi Kasahashi et Shinya Yamanaka (Prix Nobel de médecine en 2012) à l’université de Kyoto (49). Dans leur travaux la reprogrammation est obtenue par l’infection de fibroblastes murins via des rétrovirus permettant la surexpression de 4 gènes choisis parmi une liste de 24 gènes (49): Oct4 (50,51), Sox2 (52) qui codent pour des facteurs de transcription régulant la pluripotence et Klf4 (53) et c-Myc (54) qui codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation tumorale. Cette technique qui consiste donc à introduire des gènes dans une cellule adulte pour qu’ils s’y expriment, fut ensuite rapidement adaptée à l’Homme par la même équipe en reprogrammant des fibroblastes de derme humain avec la même combinaison de gènes (17). Dans le même temps, l’équipe américaine de James A. Thomson a également généré des iPS en utilisant une combinaison de gènes légèrement différente (55) : NANOG (56,57), OCT4 (50,51), SOX2 (52)et LIN28 (58). Les fibroblastes reprogrammés en iPS par l’une de ces méthodes présentent un phénotype semblable aux CSEh en termes de morphologie, prolifération et expression des marqueurs de pluripotence. En revanche l’expression génique et épigénétique des CSEh et iPS à l’échelle

du génome entier montre des profils différents (59). Bien que les fibroblastes cutanés dont l'accès est simplifié, soient les plus utilisés, il a été montré qu'il était également possible d'obtenir des iPS à partir de toutes les cellules somatiques qui prolifèrent en utilisant des « cocktails » de facteurs de pluripotence différents (60). On peut ainsi obtenir des iPS à partir de kératinocytes (61), de cellules neurales (62), de cellules du foie et de l'estomac (63), de mélanocytes (64), de cellules β pancréatiques (65) ou encore de lymphocyte B (66). L'accès illimité et extrêmement facile de ces cellules par simple biopsie en font un potentiel énorme pour la médecine régénérative et leur confère un avantage par rapport aux CSEh.

Cependant, bien que ne relevant pas de problème éthique, le risque de tumorigénicité lié à l'induction de la pluripotence reste un problème (67,68). En plus d'induire la formation de tératomes si elles ne sont pas totalement différenciées avant injection chez le patient comme les CSE (11), les iPSC sont exposées à un certain nombre de facteurs qui pourraient favoriser l'oncogénèse, par l'insertion génomique de vecteurs de reprogrammation, la surexpression des facteurs de transcription oncogènes et une hypométhylation globale ressemblant à celle observée dans les cancers (41). L'administration des gènes via des vecteurs viraux capables de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte entraîne des risques de mutations et d'expression prolongée de ces gènes, et a donc été remplacée par des techniques d'administration de gènes minimisant ces perturbations génomiques (41). Parmi ces méthodes, les chercheurs utilisent des vecteurs intégrateurs qui peuvent être excisés du génome hôte et des vecteurs non-intégratifs tels que les plasmides ou le virus Sendaï qui pénètrent dans la cellule puis finissent par se perdre au cours des divisions (69-71). Le potentiel tumorigène des iPS est un élément clé pour leur intégration dans des essais cliniques et se veut pour le moment compromettant.

Actuellement, comme les CSEh, les iPS sont utilisées en recherche fondamentale et dans l'industrie pharmaceutiques pour modéliser des pathologies ou tester l'efficacité thérapeutique de nouvelles molécules (60). Contrairement aux CSEh prélevées d'embryons dont on ignore le patrimoine génétique, la possibilité de sélectionner les donneurs en fonction de ce patrimoine permet de modéliser la pathologie directement à partir de cellules porteuses de ladite maladie. Elle offre aussi l'avantage de pouvoir étudier les différentes étapes de la pathologie puisque, contrairement aux cellules adultes prélevées à un stade déjà avancé de la maladie au moment du diagnostic, les iPS

reprogrammées à partir de ces cellules adultes vont se différencier *in vitro* en retraçant les différentes étapes de la pathologie et ainsi permettre aux chercheurs de comprendre l'évolution de celle-ci (60). Des lignées d'iPS sont déjà disponibles pour étudier des dizaines de maladies comme la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer (72) ou encore le diabète de type 1 (73), la dystrophie musculaire de Duchenne (74)...

Dans le domaine de la thérapie cellulaire, comme indiqué précédemment, ces cellules offrent le même espoir que les CSEh à ceci près qu'elles ne présentent pas de problème éthique et sont extrêmement facile d'accès (75). Au même titre que les CSEh, les iPS utilisées en médecine régénérative devront être de grade clinique et répondre aux normes GMP (16,39). En raison des problèmes d'anomalies épigénétiques (76) et de la tumorigénicité prononcée de ces cellules (41), la qualité de grade clinique exigée peut être plus rigoureuse que celle des CSEh (16).

Afin de pallier au problème de rejet de greffe qui peut se produire lors de l'injection de cellules allogéniques telles que les CSEh, les chercheurs créent des banques de cellules marquées selon leur profil immun, c'est le cas par exemple, du japonais shinya Yamanaka (77) qui développe actuellement une banque cellulaire d'iPS humaines de grade clinique. En effet, la possibilité de choisir le donneur en fonction de son profil génétique permet de prévenir le rejet de greffe en choisissant des cellules thérapeutiques compatibles avec le profil du receveur. De plus, la création de ces banques cellulaires permettra de réduire les délais de traitement en ayant des cellules thérapeutiques « prêtes à l'emploi ».

A ce jour, **un seul essai clinique a été effectué** par l'équipe de Masayo Takahashi du RIKEN Center for Developmental Biology (Essai non répertorié sur ClinicalTrials.gov). Celui-ci vise à traiter 6 patients atteints de DMLA via l'injection de cellules rétiniennes dérivées d'iPS reprogrammées à partir de cellules de la peau (78). A l'inverse des essais cliniques réalisés à partir des CSEh pour traiter cette même pathologie, cet essai utilise des cellules iPS autologues et ne nécessite donc pas de traitement immunosuppresseur. La première injection a été effectuée en septembre 2014 sur une femme âgée de 77 ans. Une seconde a eu lieu par la suite sur un homme âgé de 68 ans. Les résultats récemment publiés (79) montrent une amélioration visuelle chez la première patiente. Cependant l'essai a dû être stoppé en 2015 en raison de cellules mutées détectées sur les iPS devant être injectées chez le second patient. A la suite des recherches réalisées pour comprendre d'où provenaient ces mutations, il a été décidé de reprendre cet essai en 2017 en utilisant

des iPS issues de banque cellulaire en parallèle des iPS provenant des patients jusque-là utilisées.

En 2016, l'équipe japonaise du CiRA (Center for IPS cells Research and Application) sous la direction de Jun Takahashi, a publié un article dans Stem Cell Reports annonçant la préparation d'un deuxième essai clinique utilisant des iPS pour traiter la maladie de Parkinson (80).

Par ailleurs, le professeur japonais Yoshiki Sawa de l'université d'Osaka attend la validation de son projet visant à utiliser des iPS reprogrammées en cardiomyocytes, pour une étude clinique sur trois patients atteints de cardiopathie ischémique.

Tout comme pour les CSEh, les applications possibles des iPS dans le domaine de la recherche sont nombreuses : modélisation du développement des tissus et des organes, étude des mécanismes à l'origine de pathologies, criblage médicamenteux en étudiant la capacité des molécules à restaurer des anomalies observées sur les cellules.

Concernant les iPS, il reste à surmonter certains problèmes à savoir, le taux de reprogrammation faible, la possibilité d'anomalies génétiques induites par la reprogrammation ou la culture des cellules, la possibilité d'anomalies épigénétiques acquises avant ou au cours de la reprogrammation. Pour ces raisons, les CSEh restent aujourd'hui la référence dans la pluripotence des cellules souches. Les progrès rapides et les espoirs sur le plan thérapeutique imposent alors de réfléchir aux aspects éthiques et légaux soulevés par ce nouveau type de cellules.

Afin de pallier à ces obstacles, les cellules souches multipotentes restent à ce jour les plus utilisées en thérapie cellulaire.

1.2. Cellules souches multipotentes

Les CSE pluripotentes laissent place au cours du développement embryonnaire à des cellules de plus en plus différenciées (Figure 1). Les cellules souches multipotentes comme les CSE conservent des capacités d'auto-renouvellement et sont capables de se différencier en différents types cellulaires (10). Cependant leur spectre de différenciation est plus limité que celui des CSE car elles sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique. Elles ne peuvent donc donner naissance qu'à différentes lignées cellulaires du tissu dont elles sont issues (81,82). Parmi les cellules souches multipotentes on trouve les

cellules souches fœtales prélevées sur des fœtus issus d'une interruption volontaire de grossesse (non abordées ici) et les cellules souches adultes (CSa) tissulaires. Ces dernières, présentes dans les différents organes et tissus de l'organisme à régénération rapide, participent à leur maintien dans un état physiologique. Localisées dans un microenvironnement physique et chimique appelé « niche » (83), leur permettant de maintenir leurs identités et assurant leur devenir, elles génèrent des cellules fonctionnelles différenciées afin de remplacer les cellules perdues au cours de la vie (84). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (85) et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (86) représentent les deux exemples les mieux décrits mais il existe de nombreuses CSa telles que les cellules souches neurales (87), les cellules souches gastro-intestinales (88), les cellules souches épidermales (89), les cellules souches hépatiques (90)...

Les CSH sont issues d'une cellule unique appelée hémangioblaste (91). Celle-ci dérive des cellules du mésoderme embryonnaire, et se forme dans le sac vitellin au cours de la troisième semaine de vie embryonnaire. L'hémangioblaste est à l'origine des CSH et des cellules souches endothéliales, ce qui en fait le précurseur des CSH mais aussi des CSM (92) capables de se différencier en cellules endothéliales (93) (Figure 4).

Les CSH ont été les premières étudiées puisqu'aisément accessibles. C'est en 1961 que Till et MacCulloch ont démontré, pour la première fois, l'existence d'une CSH chez la souris (94). Retrouvées au niveau de la moelle osseuse, en libre circulation dans le sang périphérique (81) (on parle alors de cellules souches périphériques) et au niveau du sang du cordon ombilical (95), elles sont à l'origine de toutes les lignées sanguines : érythropoïétique (globules rouges), mégacaryocytaire (plaquettes), et myélopoïétique (globules blancs) (Figure 4), et ont donc la capacité de reconstituer les propriétés hématogènes de la moelle osseuse après aplasie médullaire (96).

Les CSM dont le terme a été introduit par Arnold Caplan en 1991 (97), ont été isolées pour la première fois de la moelle osseuse dans les années 1970 par le chercheur russe Friedenstein (98,99). Elles sont également présentes en plus faible proportion au niveau du tissu adipeux (cellules souches adipeuses humaines CSAh), du tissu osseux, du sang placentaire ou du liquide amniotique. Faciles à prélever au niveau du tissu adipeux et de la moelle osseuse, elles sont capables de générer différents types cellulaires appartenant aux tissus squelettiques telles que : les chondrocytes (cellules du cartilage), les

ostéoblastes (cellules osseuses) et les adipocytes (cellules graisseuses) mais également les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (86,93) (Figure 4).

Tout comme les CSH (81), de récentes études montrent que les CSM seraient douées d'une plasticité (10,93,100) qui leur permet de se différencier en cellules autres que celles du tissu dont elles sont issues (Figure 4). Elles peuvent donc, en fonction des stimuli extérieurs, donner naissance à des cellules neurales (cellules nerveuses), des myocytes (cellules musculaires), des cellules hépatiques (cellules du foie) ou des cellules cardiaques par exemple (86,101–104) En plus d'être douées de multi-potentialité, les CSM possèdent des propriétés de régulation immunologique (105) et inflammatoire prometteuses pour la thérapie cellulaire puisque limitant le rejet de greffe. En effet, les CSM n'expriment pas d'antigène HLA de classe II à leur surface (105,106) et que faiblement ceux de la classe I (105), limitant leur reconnaissance par le système immunitaire. De plus elles n'induisent pas la prolifération lymphocytaire T en raison du manque de marqueurs CD28 à leur surface (106), et sont capables de réguler la réponse immunitaire en induisant l'activité des lymphocyte T régulateur (Treg), favorisant ainsi la tolérance immunitaire (106). En outre, les CSM influent sur les lymphocytes T auxiliaires (T helper, en anglais) en inhibant la production d'interférons gamma ($INF\gamma$) pro-inflammatoires et en augmentant celle des interleukines-4 (IL-4) anti-inflammatoires (105), régulant alors les processus inflammatoires.

Les CSa sont isolées différemment selon le tissu dont elles sont issues mais également suivant le type de cellules que l'on souhaite isoler. Ainsi pour les isoler de la moelle osseuse, une ponction effectuée sous anesthésie générale suivie d'un immunomarquage est nécessaire pour obtenir une population cellulaire homogène (10,81). Il est également possible de les isoler du sang périphérique par plasmaphérèse après avoir stimuler leur passage dans le sang à l'aide de cytokines (107). Présentes en faible proportion dans les différents tissus, une amplification cellulaire *in vitro* est réalisée avant de les utiliser en thérapie cellulaire.

Contrairement aux CSE, les CSa peuvent être prélevées sur le patient lui-même. Elles sont dites « autologues » et sont donc parfaitement tolérées par le patient sur le plan immunitaire, ce qui leur offre un avantage incontestable (10) dans le cas de la thérapie cellulaire. Cependant, ce type de thérapie est coûteux et long puisque les chercheurs sont obligés de les amplifier extemporanément allongeant alors la durée du traitement (10) en comparaison à l'utilisation de cellules thérapeutiques prêtes à l'emploi issues de banques.

Leur utilisation à partir d'un donneur est également possible, on parle alors de greffe dite « allogénique ». Dans ce cas le rejet de greffe est possible. Cependant, la greffe de CSM allogéniques se fait sans traitement immunosuppresseur en raison de leur capacité à sécréter des facteurs immunosuppresseurs et à leur faible expression de marqueurs HLA limitant ce rejet de greffe (10).

En 2002, une étude menée par l'équipe de Catherine Verfaillie a montré l'existence de cellules précurseurs des CSa, les **MAPC** (Multipotent adult progenitor cells) (82,108). Ces cellules expriment les facteurs de transcription Oct4 et Nanog caractéristiques des CSE pluripotentes. Tout comme les CSE, leur potentialité de différenciation s'étend au 3 feuillets embryonnaires : mésodermique, endodermique et ectodermique (Figure 4). Ces précurseurs des CSH et des CSM auraient alors les mêmes capacités de différenciation des CSE avec l'avantage de ne pas engendrer de tumeur et d'être prélevés chez l'homme et non chez l'embryon. Cette découverte offre de nouveaux espoirs aux chercheurs qui voient leur champ d'investigation s'étendre avec la possibilité de prélever par simple ponction de moelle osseuse, des cellules souches adultes « pluripotentes ».

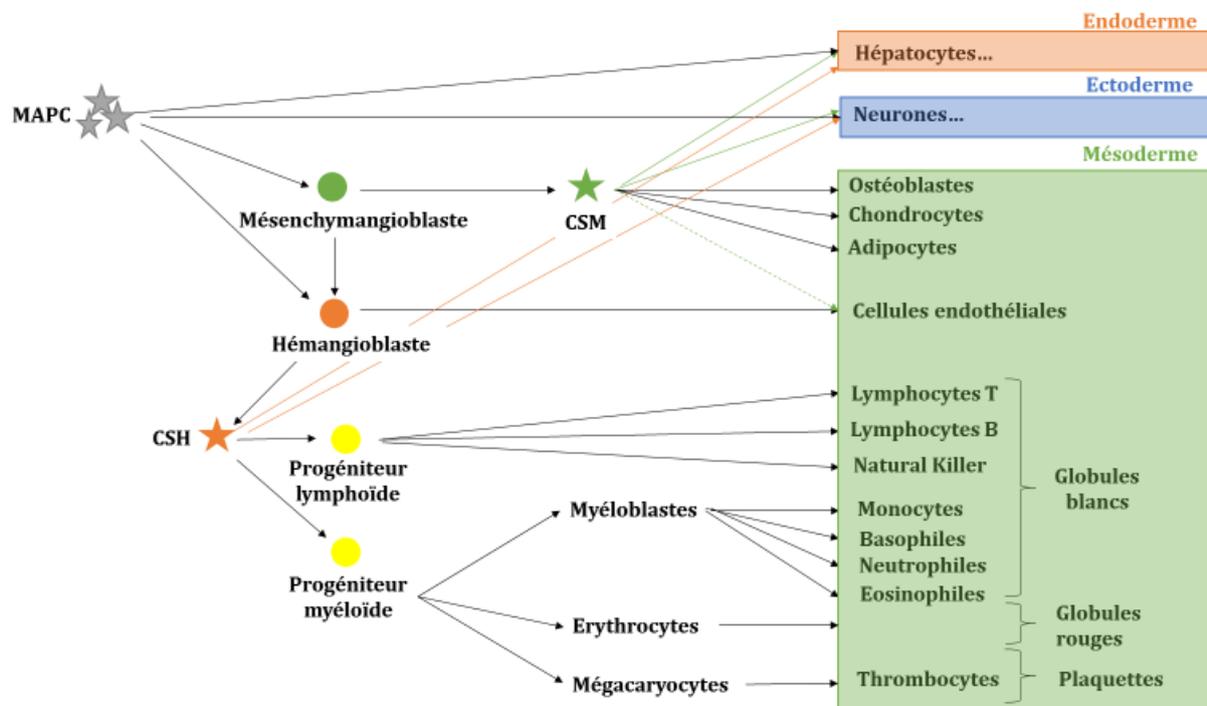


Figure 4. Différenciation multi-lignée des cellules souches multipotentes et de leurs précurseurs (Adapté d'après Coulombel, 2003 (109)).

A ce jour, les CSA sont couramment utilisées dans les traitements de thérapies cellulaires en raison de leur accessibilité (pour la plupart). De plus, elles ne relèvent pas de problème éthique comme les CSE et sont plus sûres que les iPS du point de vue tumorigène.

Dotées d'une plasticité jusque-là insoupçonnée, leur activité d'induction sur les tissus à réparer est également plus facile puisque déjà partiellement spécialisées. En revanche, leur durée de vie et leur quantité sont plus limitées que les CSE et elles sont plus difficiles à repérer au sein de leur tissu d'origine.

On compte à ce jour, plus de **350 essais cliniques réalisés à partir de CSA** ayant obtenues le grade clinique, dont un tiers utilisent des cellules autologues (110). Ils concernent des domaines très diverses tels que : la rhumatologie (arthrose, polyarthrite rhumatoïde), les dégénérescences musculaires (myopathies), la cardiologie (accident vasculaire cérébrale, infarctus du myocarde, ischémie des membres inférieurs), le diabète, les maladies auto-immunes (lupus, sclérose en plaque)... mais également les maladies hématopoïétiques (leucémies, lymphomes), les maladies neuro-dégénératives (Parkinson, Alzheimer)...

Un certain nombre **de traitements par thérapie cellulaire** ont été validés par les autorités de santé et sont utilisés (110) :

- reconstitution de la peau à partir de cellules souches cutanées pour soigner les grands brûlés,
- greffe de moelle osseuse pour traiter les cancers hématologiques,
- perfusion de CSM pour lutter contre la maladie du greffon contre l'hôte chez l'enfant (GvHD),
- injection de CSM pour guérir l'arthrose,
- greffe de cellules souches de la cornée pour réparer les lésions cornéennes.

Les connaissances acquises sur les cellules souches ont permis aux chercheurs de faire progresser la science mais également de trouver de nouveaux traitements pour des pathologies jusque-là non traitées. Cependant toutes les cellules souches ne peuvent être utilisées dans le cadre de traitements et certaines problématiques ne sont pas résolues. Les cellules souches multipotentes sont pour le moment les plus employées et leur utilisation a prouvé de réels bénéfices.

Au vu de ces différents éléments et afin de répondre au mieux à nos besoins, nous avons fait le choix d'utiliser des CSAh. Récoltées à partir de lipoaspirations effectuées chez des

patients consentants au cours d'une chirurgie esthétique (6), ces cellules capables de se différencier en nucléopulocytes appelés aussi « chondrocytes-like » (111), nous permettent d'envisager un nouveau traitement pour la dégénérescence discale.

Toutefois, l'injection *in situ* de ces cellules seules n'est pas toujours optimale. En effet, selon le site d'injection elles peuvent être soumises à de nombreuses agressions (changement de pH, attaque enzymatique...) provoquant leur perte. Une autre approche de médecine régénérative est donc employée afin d'y pallier. Il s'agit de l'ingénierie tissulaire que nous allons désormais développer.

2. Ingénierie tissulaire

Apparue au cours des vingt dernières années, l'ingénierie tissulaire, basée sur les concepts du génie biologique, a été définie plus généralement par Richard Skalak en 1988 lors du Granlibakken workshop comme étant «les principes et méthodes s'inspirant de l'ingénierie et des sciences de la vie permettant de comprendre les relations fondamentales entre la structure et la fonction dans les tissus normaux et pathologiques et permettant de développer des substituts biologiques pour rétablir, maintenir ou améliorer leur fonctionnalité » (112). Cette discipline permet de concevoir en laboratoire un substitut ou « échafaudage » (« scaffold ») capable d'être le support à la croissance de nouveaux tissus et apte à être utilisé dans une application médicale spécifique (réparation de l'os, du cartilage, du muscle, de la peau, des vaisseaux sanguins...(113)). Elle fait appel à différents domaines comme la biologie (culture cellulaire), la chimie (synthèse et développement de matrices implantables), la physique et les sciences de l'ingénieur (conception de bioréacteurs). L'ingénierie tissulaire employant les cellules vivantes comme « matériel de base », recoupe de fait les applications des thérapies cellulaires.

Basée sur la **triade du génie tissulaire** (114) (Figure 5) qui dérive des trois principaux composants des tissus :

- les cellules fournissant la matière première à la formation tissulaire,
- leur matrice extra-cellulaire (MEC) qui sera mimée par un échafaudage (matrice 3D) servant à la fois de structure (attachement cellulaire, rétention spatiale, détermination morphologique) et de substrat (recrutement de l'oxygène et des nutriments) pour la croissance et le développement des tissus,
- les systèmes de signalisation via des facteurs de croissance ou stimuli biophysiques

permettant de diriger la croissance et la différenciation des cellules dans l'échafaudage, elle permet alors de reformer des tissus à l'aide de biomatériaux.

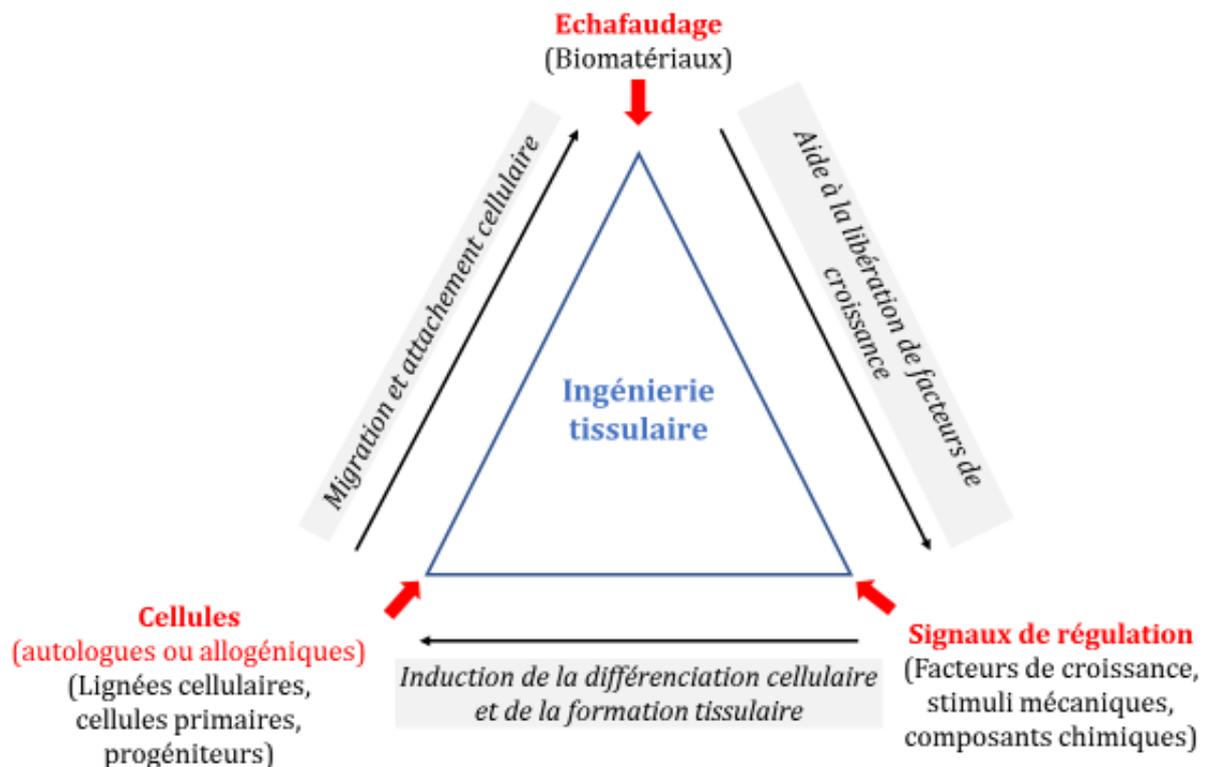


Figure 5. Les trois éléments indispensables constituant la triade de l'ingénierie tissulaire (Adapté d'après Murphy et al., 2013 (114)).

Elle a ainsi pour objectif de regrouper des cellules et des facteurs de régulation appropriés pour permettre des reconstructions tissulaires en causant le moins de complications possibles (douleurs liées à une seconde intervention chirurgicale, rejet de greffe...) (114) et en palliant aux imperfections des thérapies utilisées jusque-là pour traiter la perte d'organes ou de tissus (pénurie de donneurs, reconstructions chirurgicales susceptibles d'engendrer des cancers annexes, dispositifs mécaniques inaptes à remplir toutes les fonctions d'un organe) (113). Cette association matrice 3D-cellules constituant le produit fini de l'ingénierie tissulaire, répond selon le règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 (36), à la définition d'un MTI.

Un tissu fonctionnel peut être développé par l'utilisation de ces trois composants de la triade. Les chercheurs américains Robert Langer et Joseph Vancati ont alors identifié en 1993, trois stratégies générales employées dans l'ingénierie tissulaire (113) :

- l'utilisation de cellules isolées ou de substituts cellulaires,

- l'utilisation de substances induisant la formation de tissus,
- l'utilisation de cellules placées sur ou à l'intérieur de matrices.

La première approche est limitée par le risque de rejet cellulaire et la perte fonctionnelle de celles-ci une fois injectées. La seconde nécessite la production d'une très grande quantité de molécules signalétiques et l'élaboration de systèmes de délivrance afin d'assurer leur ciblage. La troisième stratégie quant à elle constitue un support cellulaire limitant le rejet de greffe.

Dans l'optique de concevoir un traitement viable, notre équipe a opté pour cette dernière stratégie, employant une matrice cytoprotectrice associée aux CSAh.

Les biomatériaux constituent le centre de l'avancement de l'ingénierie tissulaire. La partie suivante, s'accordera à détailler les différents biomatériaux employés afin d'en connaître les avantages et les inconvénients.

II. LES BIOMATÉRIAUX EN MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE

Les biomatériaux ont été définis par la Société Européenne des Biomateriaux lors des conférences de consensus de Chester au Royaume-Uni en 1986 et 1991 comme « des matériaux non vivants, utilisés dans un dispositif médical et conçus pour interagir avec des systèmes biologiques (tissus, organes, fluides d'un être vivant), qu'ils participent à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle » (115). Le biomatériau à proprement dit désigne le constituant d'un matériel de soin ou de suppléance.

Les biomatériaux, peuvent être utilisés associés ou non à des cellules. Ils peuvent notamment prendre la forme de prothèses à façon, injectés *in situ* ou greffés et ayant des fonctions purement mécaniques. Ou encore être colonisés post-injection par des cellules endogènes. Pour permettre la prolifération cellulaire, une variété d'échafaudages (matrices 3D) ont été développés à partir de ces biomatériaux comme les analogues de la MEC, c'est le **biomimétisme tissulaire**. Dans l'idéal, la matrice 3D doit permettre une prolifération et une différenciation 3D *in vitro* très similaire à celle obtenue *in vivo*. Elle facilite aussi l'agrégation cellulaire.

Le biomatériau utilisé doit répondre à un certain nombre de critères pour la conception

de la matrice dont deux sont cruciaux :

- la **biocompatibilité**, c'est-à-dire qu'il doit être capable de supporter la croissance cellulaire et la régénération tissulaire *in vivo*, sans provoquer une réponse inflammatoire ou immunogène qui pourrait entraîner son rejet (116),
- la **biodégradabilité**, c'est-à-dire qu'il doit se dégrader en produits non toxiques (116).

La durée de dégradation de la matrice 3D doit être compatible avec le temps de régénération du tissu cible (114). Dans le cas de la délivrance de substances actives, la dégradation doit être contrôlée à un rythme assurant une libération optimale (114).

Le choix du biomatériau, ainsi que sa micro et macrostructure influenceront la biocompatibilité et la dégradabilité de cette matrice 3D.

Le biomatériau doit également (117,116) :

- être « poreux » afin d'assurer la migration cellulaire, la diffusion des molécules de signalisation et des nutriments, et la mise en place d'une vascularisation,
- pouvoir adhérer au tissu hôte,
- avoir un degré approprié de résistance mécanique pour supporter la fonction des tissus et une cohésion mécanique suffisante pour éviter les fuites ou l'extrusion après implantation,
- être stérilisable sans que cela altère ses propriétés,
- et idéalement implanté de façon minimalement invasive soit en étant injectable soit en ajustant la forme et la taille de la matrice 3D à celles du tissu à réparer.

Les biomatériaux potentiellement utilisés en ingénierie tissulaire comprennent les métaux, les céramiques, les polymères synthétiques et les polymères naturels ainsi que des combinaisons de ces matériaux (116). Ils sont rarement utilisés seuls mais plus souvent associés à des dispositifs médicaux.

1. Les principales classes de biomatériaux utilisées en ingénierie tissulaire

1.1. Les métaux et alliages métalliques

Ces biomatériaux sont considérés comme étant les ancêtres des biomatériaux puisqu'ils ont été les premiers à avoir été utilisés pour réaliser des implants et le sont toujours actuellement. Utilisés en chirurgie orthopédique dans un premier temps (fracture

ouverte, arthroplastie de la cheville ou du genoux, remplacement total ou arthroplastie de la hanche...), ils se retrouvent également en chirurgie orale et maxillo-faciale (implants dentaires, vis et plaques crânio-faciales), en chirurgie cardiaque (partie de cœur artificiel, pacemaker, cathéter à ballonnet, valve, clip d'anévrisme) (118).

L'**acier inoxydable** est le plus important de cette catégorie et est encore largement utilisé dans le remplacement de tissus orthopédiques. Son intérêt réside dans ses propriétés mécaniques.

Les **alliages à base de cobalt et de titane** sont également très utilisés. L'avantage principal du titane est sa bonne biocompatibilité : l'os adhère spontanément au titane (ostéo-intégration). Cependant sa microstructure rend difficile la réalisation d'un revêtement à sa surface. En outre, comme le cobalt, il résiste à la corrosion mais ne l'empêche pas.

D'autres **alliages à base de chrome, de molybdène ou du tantale** sont également disponibles.

Les métaux et alliages métalliques posent certains problèmes quant à leur utilisation. Ils peuvent être soumis à une corrosion électrochimique. De plus, étant solides de possibles débris peuvent s'accumuler dans le tissu hôte sous l'effet des contraintes mécaniques subies entraînant des réactions d'hypersensibilité. Autres désavantages quant à leur utilisation, ils ne sont pas biodégradables et leur processabilité reste difficile (116).

1.2. Les céramiques

Les céramiques sont des matériaux inorganiques non métalliques caractérisées par une température de fusion élevée, utilisée pour leur fabrication et un comportement mécanique à la fois rigide et fragile déterminant pour leurs applications (116). Ce sont des matériaux difficiles à déformer et fragiles puisque ne pouvant pas absorber l'énergie des chocs subits.

Les céramiques comprennent les oxydes, les sulfures, les borures, les nitrures, les carbures et les composés intermétalliques. Elles sont divisées en 3 groupes (116) :

- les **céramiques bio-inertes**, dont l'alumine et la zircone qui entrent dans la composition des têtes de prothèses de hanche ou dans les implants dentaires telles que les couronnes. L'alumine offre l'avantage de résister à la corrosion, à l'usure, à la

pression et d'être biocompatible (118). Elle entre dans la composition des prothèses du genou, de substituts osseux ou encore dans les prothèses de la cornée. La zirconie quant à elle est intéressante de par son faible module d'élasticité et sa grande résistance (118).

- les **céramiques avec une surface bio-active**, tel que l'hydroxyapatite (HA) à base de phosphate de calcium. De formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, elle est utilisée sous forme poreuse ou dense. Sa microstructure permet la croissance d'un réseau cristallin en continuité avec la trame minéralisée de l'os (118).
- les **céramiques biorésorbables**, comme le phosphate tricalcique β (β TCP) de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ qui est une forme poreuse du phosphate de calcium. Plus soluble que l'HA, sa dissolution entraîne une augmentation locale en ions calcium et phosphate dont la précipitation favorise la minéralisation (118).

L'HA et le β TCP sont particulièrement utilisées dans différentes applications incluant les implants dentaires, le traitement parodontal, l'augmentation de la crête alvéolaire, l'orthopédie, la chirurgie maxillo-faciale et l'oto-rhino-laryngologie.

Ces biomatériaux bien qu'ayant certains avantages pour de nombreuses applications, ne sont pas biodégradables (hormis le β TCP) (116). Pour cette raison les scientifiques se tournent vers les polymères qui semblent intéressants.

1.3. Les polymères synthétiques

Les polymères sont des macromolécules constituées de petites unités qui se répètent.

Deux catégories de polymères synthétiques sont distinguées :

- les **polymères fonctionnels**, présentent une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant. La fonctionnalisation du polymère consiste à fixer sur le polymère des groupements ionisés. Elle peut être obtenue suite à une modification de l'état de surface du polymère par implantation ionique ou par greffe de substances fonctionnelles.
- les **polymères résorbables**, comprennent les polyanhydrides et/ou polyaminoacides (impliqués dans les formes retardes, à libération prolongée, de médicaments) mais également les polyesters dont les plus communément utilisés sont les copolymères d'acide lactique (par exemple l'acide polylactique PLA) et d'acide glycolique (par exemple l'acide polyglycolique PGA). Ces derniers sont

largement utilisés en chirurgie traumatologique et font partie des polymères synthétiques approuvés par les autorités de santé et ayant fait leur preuve en clinique (116).

Leur intérêt principal réside dans le fait qu'ils peuvent être produits en grande quantité. Néanmoins les conditions de synthèse devront répondre aux exigences de biocompatibilité (absence de solvant par exemple). La plupart des polymères synthétiques sont dégradés par hydrolyse chimique et insensibles aux processus enzymatiques, de sorte que leur dégradation ne varie pas d'un patient à un autre (116). Le fait qu'ils soient des macromolécules leur offre l'avantage de pouvoir leur faire adopter de nombreuses conformations spatiales et font d'eux de bons candidats pour l'élaboration de matrices 3D sophistiquées. Cependant, l'utilisation des polyesters dans les applications nécessitant une certaine souplesse semble compromise en raison de leur rigidité (116). De plus, il est indispensable de déterminer quels vont être les produits de dégradations des polymères non résorbables (tout comme pour les produits de dégradation des polymères résorbables) afin d'évaluer les effets biologiques et les risques qu'ils pourraient engendrer *in vitro* (toxicité, réaction inflammatoire). De même, il est important, de comprendre et connaître les réactions de biocompatibilité en surface des polymères fonctionnels afin de prévenir d'éventuels rejets (immunogénicité) (116).

1.4. Les matériaux d'origine naturelle

Afin d'assurer la biocompatibilité des matrices 3D, les scientifiques ont menés de nombreuses recherches sur l'utilisation de biomatériaux d'origine naturelle capables de simuler de près le milieu cellulaire natif.

Parmi eux, on retrouve des **composés naturellement présents dans les tissus** tels que l'acide hyaluronique par exemple, ou le collagène. De nombreux **polysaccharides** naturels sont également répertoriés. Abondamment disponibles, ils sont souvent peu coûteux. Il s'agit des formes naturelles des polymères comme les polysaccharides extraits d'algues marines (les fucanes, l'alginate), d'animaux marins (porite de corail), d'exosquelettes d'insectes (la chitine, qui une fois désacétylée donne du chitosan) ou synthétisés par les végétaux (la cellulose, qui une fois transformée donne l'hydroxypropylmethylcellulose, HPMC). Les polysaccharides obtenus après transformation bactérienne du saccharose (le dextrane) ou encore de l'action de

champignons sur l'amidon (le pullulane).

Les polysaccharides forment un groupe hétérogène de polymères de composition multiple et variée, et de longueurs différentes. Ce sont des hydrates de carbone ayant pour formule générale $(-[\text{Cx}(\text{H}_2\text{O})_y])_n$, construits à partir de résidus monosaccharidiques (oses) liés entre eux par des liaisons dites glycosidiques. Les polysaccharides possèdent de nombreux groupements réactifs (hydroxyle, acides carboxyliques, amines) qui permettent d'envisager de nombreuses réactions de modifications chimiques, pour des applications notamment dans le domaine biomédical. Ils interviennent ainsi dans des applications d'odontologie, d'orthopédie, d'ophtalmologie, de cardiologie, d'urologie ou encore d'endocrinologie et se retrouvent sous forme de pansements, d'éponges, de poches, d'implants...

Les polymères naturels sont naturellement dégradés par des enzymes, ils offrent ainsi l'avantage d'une dégradation des matrices 3D par métabolisation *in vivo* (118). Similaires aux macromolécules présentes dans l'organisme, ils permettent de pallier aux risques de réactions inflammatoires ou de toxicité qu'engendrent les polymères synthétiques (118). En revanche, leurs structures plus complexes rendent les processus de développement plus difficiles à mettre en œuvre (118). Les protéines quant à elles, entraînent un risque accru d'immunogénicité en raison de leur grande similarité avec les substances naturellement présentes dans l'organisme et leur nature thermosensible oblige à adapter les procédés de développement en conséquence (118). Par ailleurs, l'utilisation de matériaux d'origine animale et ceux issus de tissus biologiques, tels que le collagène et la chitine par exemple, entraînent une grande variation de « lot à lot » limitant grandement l'étendue de leurs applications (116,118).

Malgré l'utilisation répandue des biomatériaux en ingénierie tissulaire, nombreux sont ceux qui ne remplissent pas l'ensemble des qualités requises pour l'application visée et dont les propriétés fonctionnelles à l'interface avec les systèmes biologiques ne sont pas suffisantes. Ainsi, les matrices 3D utilisées en ingénierie tissulaire sont souvent élaborées à partir de l'association de plusieurs types de biomatériaux, on parle alors de **matériaux composites** (118). Ceux-ci consistent à l'assemblage d'au moins deux biomatériaux non miscibles mais ayant une forte capacité d'adhésion et dont les propriétés se complètent. Il s'agit souvent d'une matrice renforcée par des fibres ou des particules plus ou moins grosses d'un autre matériau permettant d'améliorer la qualité de la matière face à

certaines applications.

Au vu des différents éléments que nous venons d'aborder, notre équipe a fait le choix d'utiliser un modèle d'ingénierie tissulaire impliquant la formation d'un matériau composite à base de deux polymères naturels, l'HPMC et le pullulane dont nous développerons les caractéristiques plus loin dans ce manuscrit (Cf. Revue bibliographique III.3.1.)

Les formes de ces matrices 3D sont nombreuses et peuvent être celles d'une masse poreuse, d'une mousse, d'un liquide visqueux ou encore d'un hydrogel. Ce dernier correspondant à la forme réticulée des polymères hydrophiles, constitue une nouvelle classe de biomatériaux dont le potentiel est prometteur pour les applications de médecine régénérative. Afin de mieux comprendre pourquoi, nous y consacrerons le chapitre suivant.

2. Les hydrogels comme biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire

2.1. L'état de gel

Un gel est constitué de deux principaux composants distincts (119) :

- le **solvant** (généralement l'eau) dans lequel est dissout un composé moléculaire,
- le **soluté** formant un gel.

Sous certaines conditions de température, de pH et de concentration, la solution initiale passe à un état de gel, c'est la gélification ou transition sol-gel (solution-gel)(119). Lors de cette transition, le sol formé d'amas finis, devient un gel lorsque ces amas s'associent pour former un amas infini. Le gel résulte alors de l'agrégation de particules solides en solution ou en dispersion dans un liquide.

L'état de gel a été décrit pour la première fois en 1861 par le chercheur T. Graham (119) dans une étude sur la phase colloïdale, depuis de nombreuses études ont été menées. Il est caractérisé par la formation d'un réseau tridimensionnel de chaînes de polymères dans le solvant qui constitue la plus grande partie du volume (119,120).

Les travaux de K. Almdal, basés sur ceux établis par P. H. Hermans en 1949, ont permis de fixer 3 caractéristiques de l'état de gel (120) :

- il consiste en un **système homogène**, cohérent avec deux constituants : une phase solide contenant une phase liquide dont elle empêche l'écoulement,
- **chacune des deux phases occupe la totalité du volume du gel**,
- le gel se comporte comme un **solide viscoélastique**.

Ainsi, les gels de polymères sont un état particulier de la matière puisqu'ayant à la fois les propriétés types des solides (élastiques) et des liquides (visqueux)(121). L'élasticité traduit la capacité du polymère à conserver et restituer de l'énergie après déformation et la viscosité traduit sa capacité à dissiper de l'énergie. Ainsi, ils possèdent une grande capacité à se déformer tout en étant capables de revenir à leur état initial. La combinaison de ces propriétés élastiques et fluidiques fait des gels de bons candidats pour de nombreuses applications biomédicales.

Les gels se forment par réticulation chimique ou interaction physique des chaînes de polymères (Figure 6) (rendues hydrosolubles par la présence de groupements hydrophiles) qui se connectent entre elles via des nœuds ou jonctions, formant un réseau interconnecté tridimensionnel.

Les gels physiques ou réversibles sont formés de liaisons inter-macromoléculaires correspondant à des interactions faibles telles que les liaisons de Van der Waals, les interactions ioniques, ou les liaisons hydrogènes, dont l'énergie est d'environ 2 kcal/mol (119) et conduisent le plus souvent à la formation de zones cristallines. Ce type de gel est transitoire, ce qui signifie que la transition sol-gel est généralement réversible en fonction des conditions de température, de pH et de force ionique. Leur sensibilité à ces conditions environnementales influe sur leur comportement de gonflement et la structure de leur réseau.

Les gels chimiques ou permanents ont quant à eux, un réseau tridimensionnel formé par des liaisons covalentes inter-macromoléculaires (119). Ces liaisons à haute énergie donnent à ces gels un caractère permanent faisant d'eux des formes irréversibles puisque leur destruction entrainerait la dégradation des chaînes polymériques constituant le gel (119). La réticulation chimique peut être obtenue par polymérisation radicalaire, réaction chimique de groupes complémentaires, photopolymérisation ou par réticulation enzymatique. Les liaisons covalentes entre les chaînes de polymères s'établissent par réaction complémentaire de groupements fonctionnels (-OH, -COOH, -NH₂ par exemple).

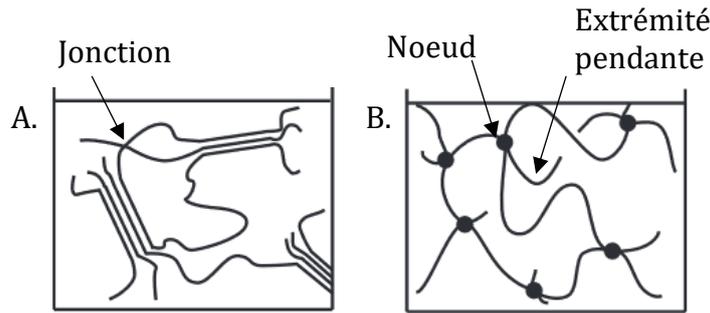


Figure 6. Structure d'un réseau de polymère dans (A) un gel physique avec des zones de jonctions cristallines ; (B) un gel chimique avec des liaisons covalentes (119).

Ces gels physiques et chimiques peuvent être classés de manière plus fine en fonction de la provenance des macromolécules (naturelle ou synthétique) ou du solvant utilisé pour gonfler le réseau de polymère (organogel ou hydrogel).

2.2. L'hydrogel

Lorsque le solvant formant le gel est l'eau, une solution aqueuse ou un fluide biologique, le gel est appelé "**hydrogel**". Celui-ci est ainsi défini comme étant un **réseau tridimensionnel de macromolécules**, naturelles ou synthétiques, capable d'absorber d'importantes quantités d'eau, de solutions aqueuses ou de fluides biologiques (de 10-20 % jusqu'à plusieurs milliers de fois sa masse sèche (122)). Le terme « hydrogel » est apparu pour la première fois en 1894 (123) et désigne un gel colloïdal de sels inorganiques. C'est en 1960 que les scientifiques Autrichiens D. Wichterle et D. Lim ont mis au point pour la première fois un hydrogel chimique réticulé à base de méthacrylate d'hydroxyéthyle (HEMA) développé comme lentille de contact (124). Depuis de nombreux travaux ont porté sur l'utilisation de ce type de biomatériau pour des applications biomédicales. En 1980, les chercheurs F. Lim et A. Sun utilisent des microcapsules d'alginate de calcium pour encapsuler des cellules des ilots de Langerhans afin de traiter le diabète (125). Ils démontrent alors l'intérêt d'encapsuler les cellules avec des hydrogels. En effet, ces derniers assurant une protection aux cellules, augmentent leur viabilité *in vivo* et permettent en outre d'obtenir une libération contrôlée des facteurs endocriniens au site lésé. Peu de temps après, l'équipe américaine de I.V. Yannas, développe une matrice 3D à base de copolymères incluse dans un hydrogel comme pansements artificiels pour soigner les brûlures (126). Les hydrogels étant des biomatériaux injectables, leur manipulation est facile et la procédure chirurgicale peu

invasive. L'emploi de ce type de biomatériaux en ingénierie tissulaire réduit les complications post-chirurgie et améliore le confort et la satisfaction du patient.

De ce fait, mes travaux ont porté sur la formulation d'un hydrogel chimique injectable. Les hydrogels chimiques sont employés comme vecteurs pour la libération locale de principe actif sans aucun stimulus (contrairement aux hydrogels physiques qui forment des systèmes inductibles selon les conditions environnementales, permettant la libération de principes actifs en réponse à un stimulus spécifique). C'est le cas de l'étude du chercheur Peter Schlegel qui démontre l'efficacité sur 92 % des patients, de la forme hydrogel pour encapsuler et délivrer l'histrelone (analogue de la gonadoreline) dans le traitement du cancer de la prostate (127). Le réseau formé dans ce type de gel, est un système homogène très hydraté. Lorsqu'ils sont élaborés à partir de polymères naturels, ils ont une structure et une composition très similaires à la MEC faisant d'eux des biomatériaux de choix pour l'ingénierie tissulaire. Leur caractère hydrophile permet alors de les utiliser comme supports de culture cellulaire (128) mais également comme implants (c'est le cas des lentilles de contacts). Nécessairement biodégradables et biocompatibles, ils ouvrent la voie à de nombreuses perspectives de biomédecine, notamment dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, utilisés comme matrices 3D pour la régénération d'une grande variété de tissus et d'organes (122).

Bien que ces hydrogels chimiques soient employés dans de nombreuses applications, l'utilisation d'agents de réticulation pouvant être toxiques pour l'organisme et les cellules (et/ou protéines) encapsulées limite leur emploi. En effet, il est primordial que la totalité de l'agent de réticulation soit éliminé avant d'utiliser ces gels dans un système biologique.

Les hydrogels ont une variété de propriétés :

- **biocompatibles** et **biodégradables ou résorbables**,
- ayant une **capacité d'absorption et de gonflement**,
- **perméables ou poreux**,
- avec des **propriétés de surface et mécaniques ajustables** (gels durs ou mous, fragile ou non, différentes formes ou textures),
- **de préférence injectables**,

qui leur permet d'être utilisés comme des éléments de structure ou de barrières, comme réservoirs de molécules bioactives ou pour encapsuler et libérer des cellules.

Par ailleurs, les hydrogels peuvent se présenter sous différentes formes en fonction de l'application visée et se trouvent utilisés comme :

- revêtement (sur des implants, des pilules ou des capsules).
- membrane ou feuille (comme réservoir dans un patch à libération sous-cutanée).
- solide encapsulé (pompe osmotique)
- liquide (formant un gel par chauffage ou refroidissement)
- solide mou (lentilles de contact).
- poudre comprimée (comprimés ou capsules pour administration orale)
- microparticules (vecteur de molécules actives, encapsulation de cellules)

Le projet global d'ingénierie tissulaire dans lequel s'intègrent mes travaux consiste à associer :

- une matrice d'hydrogel d'HPMC-si (polymère semi-synthétique) capable de supporter la croissance cellulaire

et

- un système de libération de molécules actives permettant leur différenciation en cellules discales et potentiellement capables de renforcer le gel d'HPMC-Si.

L'étude faisant l'objet de ce manuscrit concerne plus particulièrement ce dernier élément. Ce système de vectorisation biomoléculaire élaboré à partir du pullulane (polymère naturel) se présente sous forme microparticulaire, et plus précisément sous forme microsphérique. La partie suivante développera plus spécifiquement cette forme et notamment les différents modes d'obtention.

3. Les microparticules, une forme intéressante

3.1. Microcapsules et microsphères

Les microparticules sont des objets sphériques dont la taille est de l'ordre du micromètre (compris entre 1 et 1000 μm). Pour l'ingénierie tissulaire, elles sont utilisées afin d'encapsuler des cellules (129,130) dans le but de les protéger du milieu environnant (système immunitaire, enzyme...) et d'assurer le ciblage de celles-ci au site lésé. Elles servent également de vecteurs de molécules actives (130,131)(principes actifs dans le cadre de traitements médicaux, facteurs de croissance ou de différenciation dans le cadre de l'ingénierie tissulaire...). Cette forme sphérique est très employée en médecine

régénérative puisqu'aisément injectable au moyen d'une aiguille hypodermique, ce qui convient à notre application.

Les cellules ou molécules à délivrer sont donc « encapsulées ». L'**encapsulation** peut être définie comme étant le piégeage d'un ou plusieurs objets au sein d'un matériau en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structuration et sa fonctionnalisation (132). Au vu du travail réalisé, nous détaillerons seulement l'encapsulation de molécules actives. Il existe deux modes d'encapsulation (133) (Figure 7):

- au sein de microparticules avec une enveloppe (sous forme de vésicule cœur-coquille) dites « réservoirs », on parle alors de **microcapsules**. Le cœur, possiblement liquide, constitué par la molécule active et entouré d'une membrane solide de polymère réticulé enrobant.
- au sein de particules matricielles, on parle alors de **microsphères** ou microbilles. La molécule active est alors dissoute ou dispersée à l'intérieur d'un réseau matriciel de polymère réticulé.

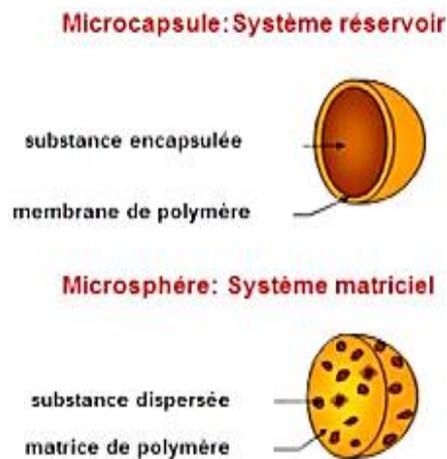


Figure 7. Les microparticules : modes d'encapsulation (134,135).

En fonction de l'application visée, différents types de microsphères peuvent être utilisées : bioadhésives, flottantes, magnétiques, radioactives ou **polymériques** (131,136,137). Ces dernières, élaborées à partir de polymères synthétiques ou naturels, offrent divers avantages (136) :

- elles permettent une libération de la molécule active constante et prolongée,
- elles sont facilement injectables en raison de leur forme sphérique et de leur petite taille.

On les retrouve dans diverses applications (131) telles que :

- la vaccination (hépatite, grippe, coqueluche, anatoxine diphtérique),
- l'administration orale de médicaments facilement dégradables (thérapie génique avec des plasmides d'ADN (Acide désoxyribonucléique), apport d'insuline...),
- l'apport médicamenteux contrôlé après application locale : libération de protéines, d'hormones et de peptides pendant des périodes prolongées à des zones ciblées,
- l'imagerie.

Pour répondre aux exigences que suppose le traitement de la dégénérescence discale mon travail s'est consacré à formuler des microsphères polymériques naturelles dont les avantages que nous venons de citer se prêtent particulièrement à notre emploi. Afin de définir la méthode de formulation la plus adaptée, le paragraphe suivant détaillera chacune des méthodes.

3.2. Les différentes méthodes d'obtention des microsphères

Plusieurs méthodes de préparation de microsphères ont été décrites dans la littérature à partir de différents biomatériaux (131,133,138). Les microsphères peuvent être préparées à partir de molécules organiques et/ou inorganiques présentées sous forme de monomères, ou plus usuellement à partir de polymères préformés synthétiques ou naturels. La classification de ces techniques s'intéresse au principe même du procédé (133,139) (Figure 8):

- **les procédés chimiques**, caractérisés par un déclenchement simultané de la formation du réseau matriciel et de l'encapsulation de la molécule active. Ceux-ci n'utilisent donc pas de matériau préformé.
- **les procédés mécaniques**, basés sur le séchage ou la solidification de gouttelettes contenant tous les constituants de la future particule.
- **les procédés physico-chimiques** dépendants de :
 - la solubilité des agents d'enrobage sous l'effet de variations des conditions physiques (température, pH (potentiel hydrogène), ajout d'un non solvant ou d'un polymère incompatible...),
 - changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobants.

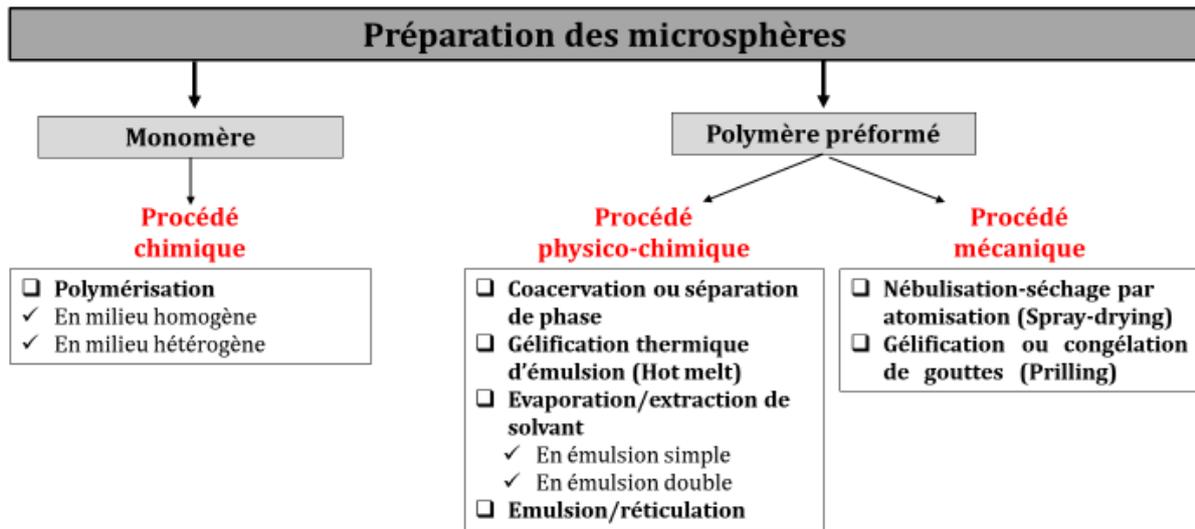


Figure 8. Les différentes méthodes d'obtention des microsphères (Adapté de Arshady, 1999 (140)).

Les différents procédés d'obtention et les paramètres de formulation (nature du polymère et de la matière active, vitesse d'agitation, viscosité de la phase dispersante, concentration en agents stabilisants, conditions d'évaporation) permettent de formuler des microsphères de taille, de forme, de texture (porosité et surface spécifique) et de structure (réseau, rigidité) différentes (140). Chacune peut avoir des propriétés spécifiques émanant d'elles même ou via l'encapsulation de particules présentant ces spécificités (fluorescence, magnétisme, radioactivité par exemple) (140).

3.2.1. Procédés chimiques

La polymérisation

La polymérisation est une réaction chimique durant laquelle des monomères réagissent entre eux pour former des molécules de poids moléculaires plus élevés, les polymères.

La polymérisation se déroule en utilisant différentes techniques (131,141) qui se distinguent selon le milieu réactionnel. Soit en milieu homogène : polymérisation en masse, soit en milieu hétérogène : polymérisation en milieu dispersé (en émulsion ou en suspension).

La polymérisation consiste en deux phases non miscibles (142) :

- une phase contenant le monomère, on parle de phase dispersée et,
- une phase continue aqueuse formant le milieu de polymérisation.

Les monomères, en présence d'initiateurs et de catalyseurs et sous l'action de la chaleur sont dispersés sous agitation en fines gouttelettes dans le milieu de polymérisation formant des chaînes polymériques (142). Des émulsifiants et des stabilisateurs peuvent également être ajoutés afin de former les polymères (142).

La polymérisation en masse

Celle-ci s'effectue en l'absence de solvant (143), le monomère (ou mélange de monomères) devenant le solvant de la réaction. Le monomère est alors directement polymérisé en présence de l'initiateur ou du catalyseur sous l'action de la chaleur (131,141). Le polymère ainsi obtenu peut être directement moulé sous forme de microsphères et l'encapsulation de la molécule active peut être effectuée pendant le processus de polymérisation (131,141). Cette méthode présente l'avantage d'avoir une vitesse de polymérisation très élevée et permet d'obtenir des polymères relativement purs (131,141). Cependant en raison de l'augmentation considérable de la viscosité au cours du processus il est difficile d'obtenir un mélange et une température uniforme (143) qui, si trop élevée, peut être délétère pour le polymère.

La polymérisation en milieu dispersé

Cette méthode regroupe plusieurs procédés dans lequel le milieu réactionnel est compartimenté. Le monomère présent dans la phase dispersée est insoluble dans le milieu de polymérisation. En fonction de la méthode choisie, l'initiateur est soit :

- présent dans la phase dispersée, soluble avec le monomère (141,142). Dans ce cas un agent de stabilisation, ajouté à la phase dispersante vient entourer les microgouttelettes formant un film protecteur. A des températures comprises entre 20°C et 100°C, la polymérisation est initiée et est rapidement totale. Dans ces conditions, les microgouttelettes sont directement converties en microsphères polymériques de même taille (142) généralement de 100 µm à 1-2 µm.
- intégré à la phase dispersante dans laquelle il est soluble (142) en présence d'un émulsifiant. L'initiateur va alors réagir avec le monomère dispersé dans le milieu de polymérisation, en diffusant à sa surface (il n'est donc pas présent dans les gouttelettes)(131) à une température comprise entre 40 et 80°C (142). Les microsphères obtenues sont de l'ordre de 50 à 300 µm.

3.2.2. Procédés physico-chimiques

L'émulsion

L'émulsion simple

Cette technique d'émulsion unique simple à mettre en œuvre et peu coûteuse, consiste à dissoudre ou disperser un polymère naturel dans un milieu aqueux, puis à disperser cette solution dans un milieu non aqueux (lipophile) sous agitation (131). On parle alors d'émulsion eau dans huile (E/H) (Figure 9).

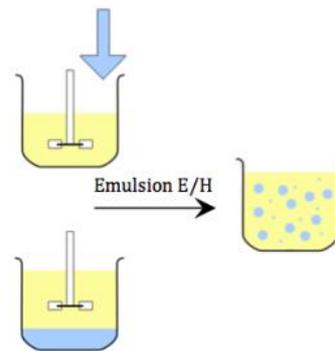


Figure 9. Schéma du principe du procédé de micro-encapsulation par la technique de l'émulsion simple (144).

Dans un second temps, les gouttelettes formées par émulsion sont réticulées au moyen de deux procédés, à savoir soit par la chaleur, soit par l'action d'agents de réticulation chimiques (glutaraldéhyde, le formaldéhyde, le chlorure de diacide, triméthaphosphate de sodium (STMP)...) (131). Les microsphères sont alors séparées de la phase huileuse par différentes étapes de lavage et centrifugation.

S'il ne se produit aucun phénomène de déstabilisation, la taille des particules est directement fonction de la taille des gouttelettes d'émulsion.

L'émulsion simple suivie d'une évaporation du solvant

Ce mode d'obtention consiste en une émulsion huile dans eau (H/E) et est donc adaptée à des polymères solubles dans les solvants organiques et des molécules actives lipophiles.

Il faut intervenir (Figure 10):

- une phase organique contenant le polymère hydrophobe, le solvant volatil organique ainsi que possiblement la molécule active lipophile à encapsuler dissoute ou dispersée dans cette phase,
- une phase aqueuse continue non solvant contenant un agent stabilisant (émulsifiant/tensio-actif).

Il repose sur deux étapes (Figure 10) (145):

- l'émulsification relative au mélange sous agitation des phases organique et aqueuse stabilisées grâce à l'agent stabilisant,
- l'évaporation du solvant.

Durant cette dernière étape, le solvant diffuse de la phase organique à la phase aqueuse par gradient de concentration grâce à un système d'évaporation établi soit à pression réduite soit sous forte agitation (131). Le solvant s'évapore ensuite à l'interface eau/air. En s'appauvrissant en solvant, le polymère contenu dans les gouttelettes de la phase organique précipite en encapsulant la molécule active. Afin de respecter les limites de réglementation en vigueur, les conditions d'évaporation devront être choisies de sorte que le solvant soit à l'état de traces.

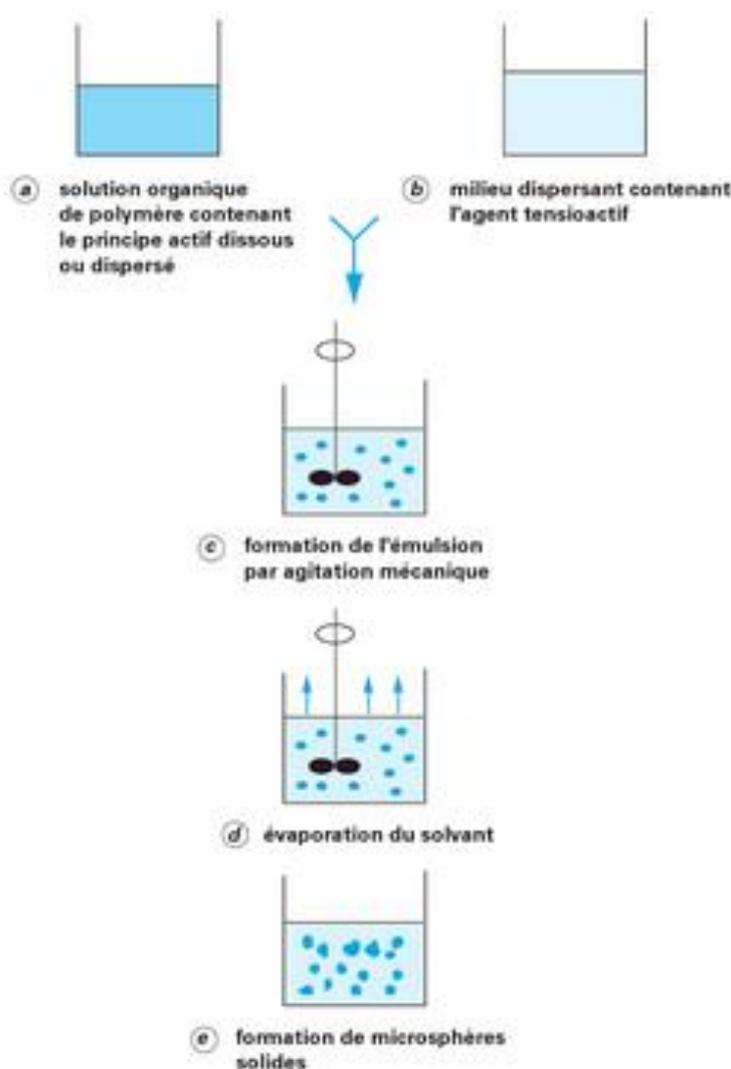


Figure 10. Schéma du principe du procédé de micro-encapsulation par évaporation du solvant (133).

Bien que le principe de cette technique soit simple, rapide et facile à mettre en œuvre, les phénomènes physico-chimiques qui régissent ce procédé sont complexes (133). La taille des microsphères obtenues va dépendre des conditions opératoires (vitesse d'émulsification, viscosité de la phase dispersante, concentration en tensio-actifs...) et est généralement comprise entre 0,5 et 200 μm (133). La principale limite de ce procédé est qu'il s'applique seulement à l'encapsulation de molécules actives lipophiles. Dans le cas de molécules hydrophiles cette méthode d'évaporation de solvant en émulsion simple devra être modifiée, afin de stabiliser la molécule active hydrophile au sein de la phase organique. On pourra avoir recours soit :

- à un co-solvant (éthanol, méthanol...) dans lequel la molécule active sera soluble (146),
- au remplacement de l'eau de la phase aqueuse externe par de l'huile. L'évaporation est alors réalisée à partir d'une émulsion non aqueuse (133) constituée de deux phases lipophiles non miscibles. Dans ce cas, la phase dispersée également de nature huileuse doit être significativement plus volatile que la phase continue dispersante. La mise en œuvre de cette méthode n'est pas toujours aisée, l'élimination des résidus huileux de la phase continue contaminant la surface des microsphères obtenues étant délicate.
- à l'ajout d'une étape d'extraction du solvant (Figure 11) (131,133), par l'ajustement du volume de la phase aqueuse dispersante permettant d'extraire immédiatement le solvant de la phase dispersée par dilution. Cette méthode implique que le solvant soit miscible à l'eau. L'avantage de ce procédé est de diminuer le temps de durcissement des microsphères et donc de figer très rapidement les microgouttes formées sous forme solide. Le taux d'élimination du solvant par extraction dépend de la température de l'eau, du rapport du volume de l'émulsion à l'eau et du profil de solubilité du polymère.
- à l'évaporation du solvant à partir d'une émulsion double (131,133). La phase organique sert alors de barrière entre les deux compartiments aqueux.

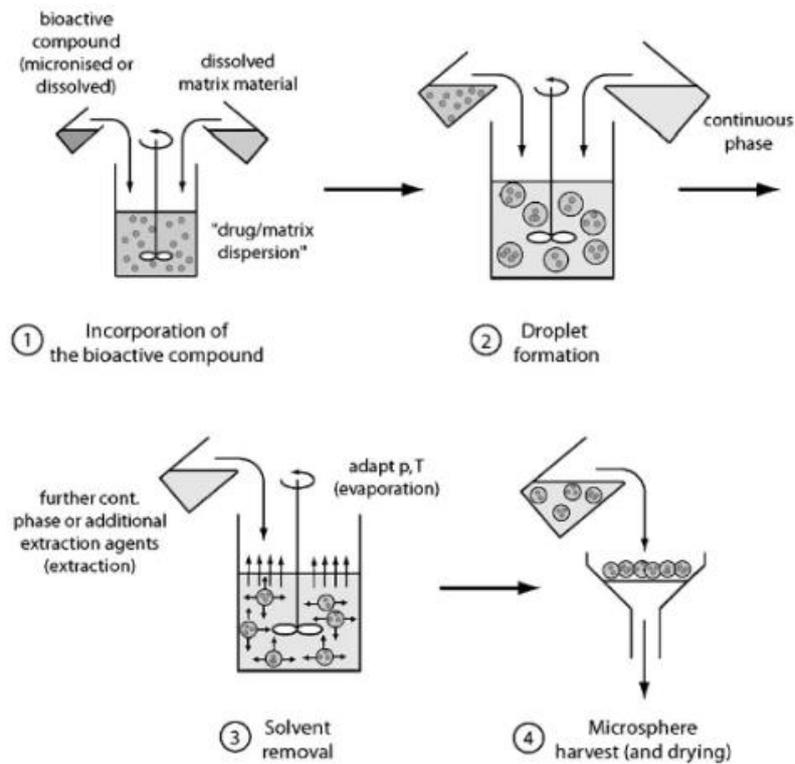


Figure 11. Schéma du principe du procédé de micro-encapsulation par la technique d'évaporation/extraction du solvant (147).

L'émulsion double

Cette méthode implique la formation d'une émulsion multiple dite émulsion de second ordre du type eau dans huile dans eau (E/H/E). Adaptée aux molécules solubles dans l'eau, aux peptides, aux protéines et aux vaccins, elle peut être utilisée avec des polymères naturels ou synthétiques solubles dans les solvants organiques.

Ce procédé s'établit en trois étapes (Figure 12) (131):

- la réalisation d'une première émulsion (de premier ordre) au cours de laquelle une solution aqueuse (pouvant contenir la molécule active) est dispersée dans une phase continue organique lipophile constituée de la solution de polymère et du solvant. Cette première émulsion est alors homogénéisée.
- une seconde émulsion est ensuite effectuée en dispersant l'émulsion de premier ordre à une seconde solution aqueuse contenant un agent de surface, formant ainsi une double émulsion.
- l'émulsion multiple formulée est ensuite soumise à l'élimination du solvant par extraction/évaporation tel que décrit précédemment.

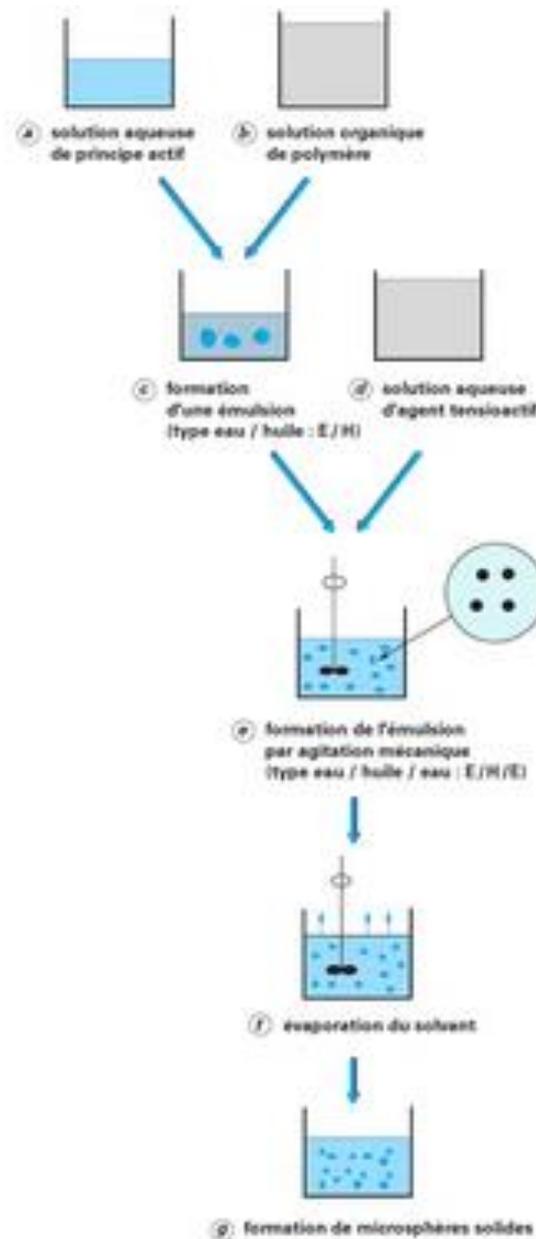


Figure 12. Schéma du principe du procédé de micro-encapsulation par la méthode de l'émulsion double (133).

- (a) Solution aqueuse du principe actif. (b) Solution organique du polymère. (c) Formation d'une émulsion type E/H. (d) Solution aqueuse d'agent tensioactif. (e) formation de l'émulsion par agitation mécanique type E/H/E. (f) Évaporation du solvant. (g) Formation de microsphères solides.

Les microsphères solides formées sont récupérées par filtration puis lavées (à l'aide de solvants organiques) afin d'éliminer les traces d'huile potentiellement restées en surface.

Cette dernière technique est plus difficile à mettre en place et peut entraîner des problèmes d'instabilité avec notamment une coalescence partielle des gouttelettes aqueuses internes résultant en des particules poreuses.

Coacervation ou séparation de phase

La coacervation se déroule en 4 étapes (Figure 13) (133,138):

- la réalisation d'une émulsion dans laquelle la molécule active (sous forme solide ou liquide) constitue la phase dispersée, et le polymère (coacervation simple) ou les polymères coexistant (coacervation complexe) forment la phase continue.
- la modification du milieu sous l'influence de l'un des différents facteurs suivants : abaissement de la température, ajout d'un non-solvant, ajout d'électrolytes ou ajout d'un deuxième polymère non compatible. Se produit alors un phénomène de désolvatation des macromolécules conduisant à une séparation de phase liquide-liquide au sein de la solution polymérique. On obtient ainsi le coacervat, correspondant à la phase la plus riche en polymère et, une solution d'équilibre, formée par l'autre phase.
- les gouttelettes de coacervat formées viennent alors s'adsorber en surface de la molécule active formant un enrobage continu.
- la réticulation de l'enveloppe des microcapsules vient finaliser ce procédé afin de solidifier la membrane et éviter ainsi un éclatement non désiré.

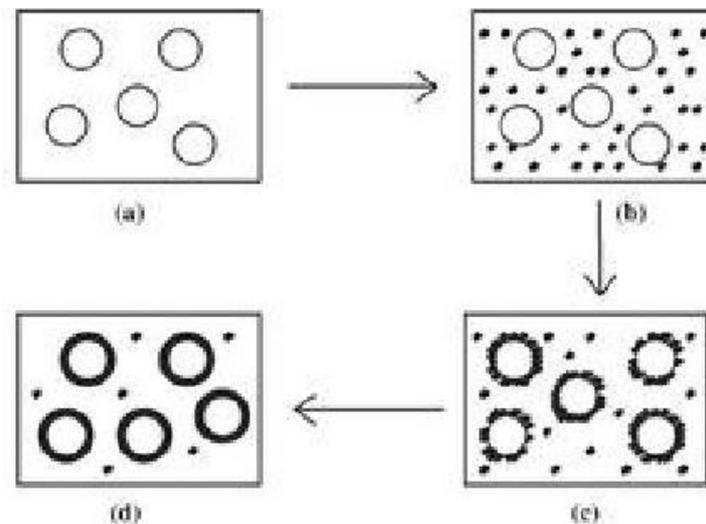


Figure 13. Schéma du principe du procédé de micro-encapsulation par coacervation. (a) Emulsion, (b) Désolvatation, (c) Adsorption des gouttelettes de coacervat en surface de la phase dispersée contenant la molécule active, (d) Réticulation de la membrane enrobante (148).

Les particules ainsi obtenues sont généralement des microcapsules. Toutefois il est possible d'obtenir des microsphères par la technique de coacervation simple lorsque la proportion de molécules actives est faible par rapport au volume de coacervat (133). Dans

ces conditions, les gouttelettes formées vont s'agréger les unes aux autres en emprisonnant les molécules actives, chaque agrégat formant une microsphère de taille comprise entre 20 et 200 μm (133).

Ce procédé nécessite un grand savoir-faire mais bien maîtrisé, il est facilement transposable à l'échelle industrielle (133).

↳ Gélification thermique d'émulsion (Holt melt)

Ce procédé repose sur la fusion du polymère (133). Au cours de ce procédé, la molécule active à encapsuler est dissoute ou dispersée dans un polymère naturel hydrosoluble chauffé. L'ensemble est émulsionné dans une phase continue dispersante, pour laquelle la molécule active n'a pas d'affinité, et dont la température a été préalablement chauffée à la même température que la solution de polymère et, est maintenue supérieure à celle du point de fusion de celui-ci (133). Sous l'effet d'un refroidissement brutal de l'émulsion, le polymère va former un gel et donner naissance à des microsphères d'une taille allant de 30 à 300 μm (Figure 14) (133). Cette méthode est applicable à des molécules actives hydrophiles (on utilise alors une phase dispersante lipophile telle que l'huile de silicone) ou lipophiles (dans ce cas l'eau distillée constitue la phase dispersante) (133).

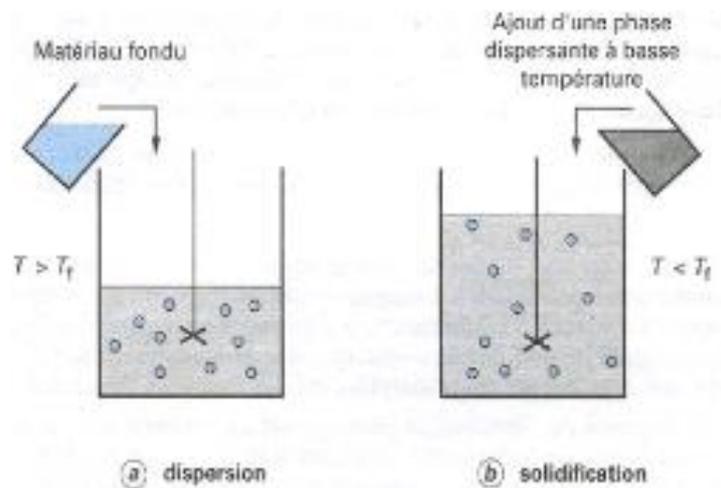


Figure 14. Schéma du principe du procédé de micro-encapsulation par gélification thermique (Holt melt) (133)

Cette méthode très simple a l'inconvénient d'entraîner la formation de formes cristallines non souhaitées et l'altération physique des microsphères au cours du refroidissement.

3.2.3. Procédés mécaniques

La nébulisation-séchage par atomisation (Spray drying)

Cette technique est utilisée dans l'industrie alimentaire depuis la fin des années 1950 pour fournir aux huiles aromatiques une certaine protection contre la dégradation/l'oxydation et pour convertir les liquides en poudres (138). En effet, il s'agit d'un procédé continu en une étape permettant d'obtenir une poudre à partir d'une solution, d'une suspension liquide, ou encore d'une émulsion.

Le polymère est dissous dans un solvant organique volatil approprié formant la phase organique continue. La molécule active à encapsuler, présente sous forme solide, y est dispersée ou dissoute (131). Cette formulation liquide est alors pulvérisée à travers une buse d'atomisation à flux d'air chaud sous forme d'un aérosol de fines gouttelettes (131). Grâce à une surface d'échange importante, le solvant va rapidement s'évaporer entraînant une augmentation de la concentration en polymère dissout et permettant ainsi la formation des microsphères solides par précipitation (Figure 15) (131).

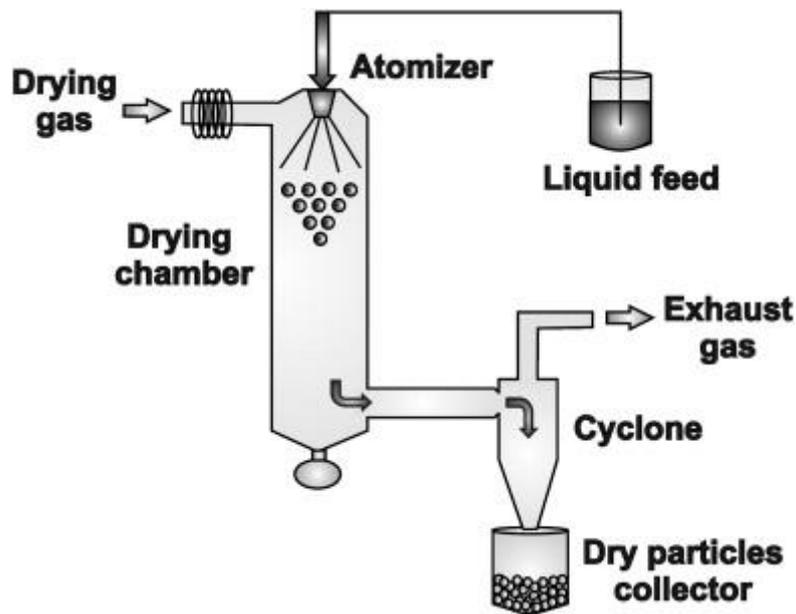


Figure 15. Schéma du principe du procédé de nébulisation-séchage par atomisation (Spray-drying) (149).

Ce procédé, bien établi, simple et bon marché (138), permet généralement l'obtention de microsphères de 1 à 50 μ m (133). Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle ne peut pas être utilisée pour les molécules thermolabiles ou volatiles qui pourraient être endommagées ou s'évaporer du fait de l'augmentation de température de ce processus.

ℳ Gélification ou congélation de gouttes (Prilling)

Que ce soit par gélification ou par congélation, les gouttes sont formées au travers d'une buse vibrante et sont recueillies dans un milieu permettant soit la gélification, soit la solidification du polymère (133).

La molécule active à encapsuler est solubilisée ou dispersée soit :

- dans une solution aqueuse d'un polymère capable de former un gel sous une action extérieure physique (température) ou chimique (pH, présence d'un composé induisant la précipitation),
- dans une solution d'un polymère ayant un point de fusion relativement bas (compris entre 50°C et 120°C).

Les gouttes formées dans l'enceinte de la buse vibrante se solidifient par gélification sous l'effet de facteurs extérieurs ou par congélation du fait de la baisse de température appliquée à l'intérieur de la buse (Figure 16 A et B) (133).

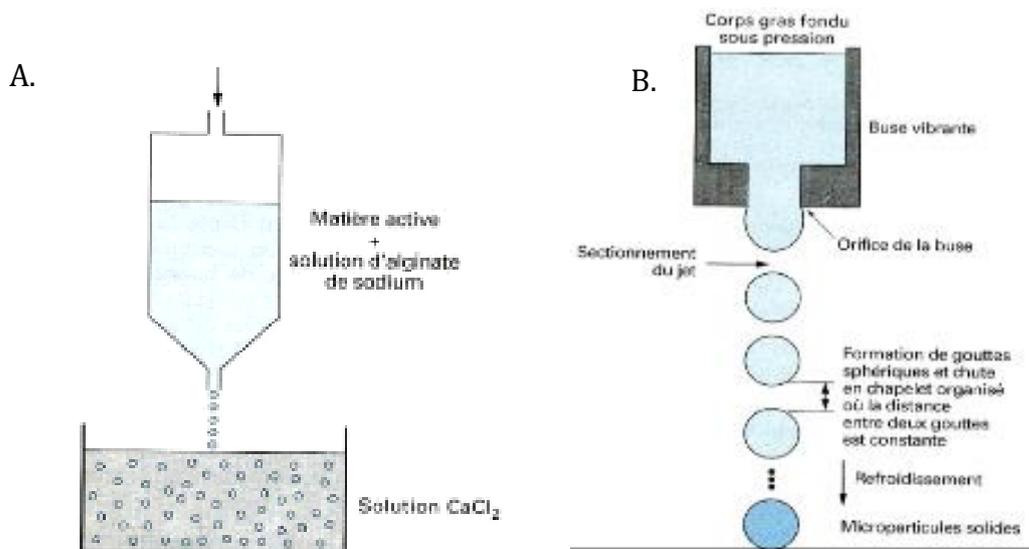


Figure 16. Schéma du principe du procédé de micro-encapsulation par (A) gélification de goutte et (B) congélation de gouttes (133).

Les microsphères obtenues par ces méthodes ont des diamètres supérieurs à 200 μm (133) ce qui limite la gamme de taille et font d'elles des techniques pas toujours adaptées.

3.2.4. Choix de la méthode

Parmi l'ensemble de ces techniques nous avons fait décider de formuler des PMBs par la méthode d'émulsion simple suivie d'une réticulation. En effet, cette méthode facile et

rapide à mettre en œuvre satisfait à nos besoins dans le cadre du traitement de la dégénérescence discale, répond aux exigences fixées et s'appuie sur un savoir-faire solidement acquis par les chercheurs du laboratoire.

Maintenant forts des connaissances que nous venons d'acquérir dans ces deux premiers chapitres qui retracent l'état de l'art sur la médecine régénérative d'aujourd'hui et plus particulièrement sur l'ingénierie tissulaire, nous consacrerons le prochain à celui de la médecine régénérative du disque intervertébral afin d'expliquer au mieux les choix établis pour la réalisation de ce travail.

III. LA MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE DU DISQUE INTERVERTÉBRAL

1. Du disque intervertébral sain au disque intervertébral dégénéré

Les disques intervertébraux (DIV) sont des structures cartilagineuses et fibreuses situées entre chaque vertèbre. Ils constituent les articulations indispensables à la cinématique rachidienne. Au nombre de vingt-trois chez l'Homme, ils permettent d'amortir les chocs au niveau du rachis, grâce à leurs propriétés élastiques (2,4). Chaque DIV est constitué de trois éléments (111) (Figure 17). L'**anneau fibreux** (*annulus fibrosus*, AF) est constitué principalement de fibres de collagène de type I organisées de manière concentrique, entourant et maintenant en place le **noyau pulpeux** (*nucleus pulposus*, NP), tissu très hydraté et composé essentiellement de protéoglycanes et de fibres de collagène de type II. Les **plateaux vertébraux** cartilagineux dans lesquels viennent s'ancrer les fibres par l'intermédiaire des plaques cartilagineuses, assurant ainsi la jonction entre les DIV et les vertèbres (2).

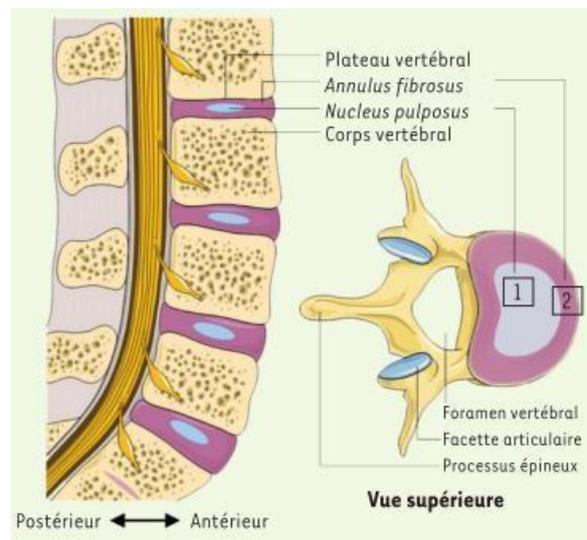


Figure 17. Organisation du rachis lombaire sain et aspect général (Adapté de Henry et al., 2014 (2)) : (1) nucleus pulposus et (2) annulus fibrosus.

Le NP, reliquat de la notochorde embryonnaire, renferme environ 3000 cellules/m² qui sont de deux types : les **cellules notochordales** (Figure 18 A) issues du nœud embryonnaire et les **nucléopulpcytes** dites « chondrocyte-like » (Figure 18 B) (3).

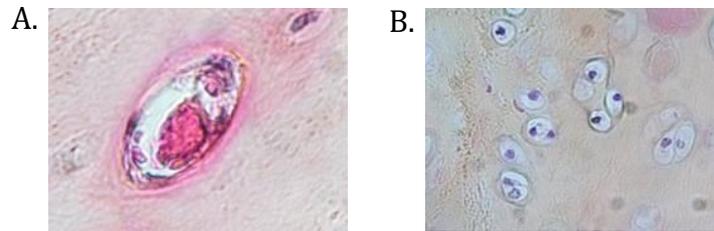


Figure 18. Images (A) des cellules notochordales et (B) des nucléopulpcytes.

A ce jour, il est admis que les cellules notochordales se différencient en nucléopulpcytes (150,151). La présence de ces deux types cellulaires dans le DIV est essentielle au maintien de l'homéostasie de la matrice extracellulaire (MEC). En effet, les cellules notochordales stimulent la synthèse de protéoglycanes par les nucléopulpcytes via la production et l'excrétion de biomolécules (152). Les protéoglycanes contenus dans la MEC du NP ont un rôle clé dans la rétention d'eau de par leur charge globale négative, et permettent de maintenir l'hyper-hydratation du NP, indispensable à ses propriétés d'élasticité et de déformation sous contrainte, lui permettant de jouer son rôle d'amortisseur et de répartiteur de pression au sein du DIV (2,4).

Sous l'influence de différents facteurs (environnementaux, mécaniques ou encore génétiques), cette structure tend vers la dégénérescence à partir de la maturité squelettique. Le processus menant à la dégénérescence discale est aujourd'hui bien analysé et prend son origine au sein du NP avec la disparition progressive des cellules notochordales à partir de la naissance. Cette disparition entraîne une rupture du dialogue moléculaire avec les nucléopulpcytes, qui disparaissent eux-mêmes ensuite progressivement (Figure 19) (2). Parallèlement à cette disparition cellulaire au cours du vieillissement, les chondrocytes des plaques cartilagineuses s'hypertrophient et synthétisent du collagène de type X. La MEC se calcifie et devient imperméable, empêchant ainsi la diffusion des nutriments mais également l'évacuation des métabolites au sein du NP. Ces événements conduisent à une acidification du pH, une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments (111). L'homéostasie de la MEC est alors rompue induisant une atteinte quantitative et qualitative de ses composants, notamment la réduction de la quantité de protéoglycanes qui s'accompagne alors d'une déshydratation

à l'origine d'une diminution des capacités de résistance aux contraintes mécaniques du DIV (Figure 19) (2,4). Les nucléopulpcytes résidant au sein du NP se trouvent ainsi exposées à d'importants stress métaboliques pouvant expliquer l'activation d'un programme de mort cellulaire (111).

L'absence de processus de réparation spontanée est liée à l'absence de vascularisation qui est une des caractéristiques essentielles du DIV (4).

La dégénérescence discale explique dans 40 % des cas les douleurs lombaires qui affectent environ 80 % de la population générale (1,153). Ces douleurs lombaires constituent un véritable problème de santé publique dont l'impact médico-économique est majeur. Ainsi, aux Etats-Unis le coût annuel lié aux douleurs lombaires a été estimé entre 100 et 200 milliards de dollars (1,2).

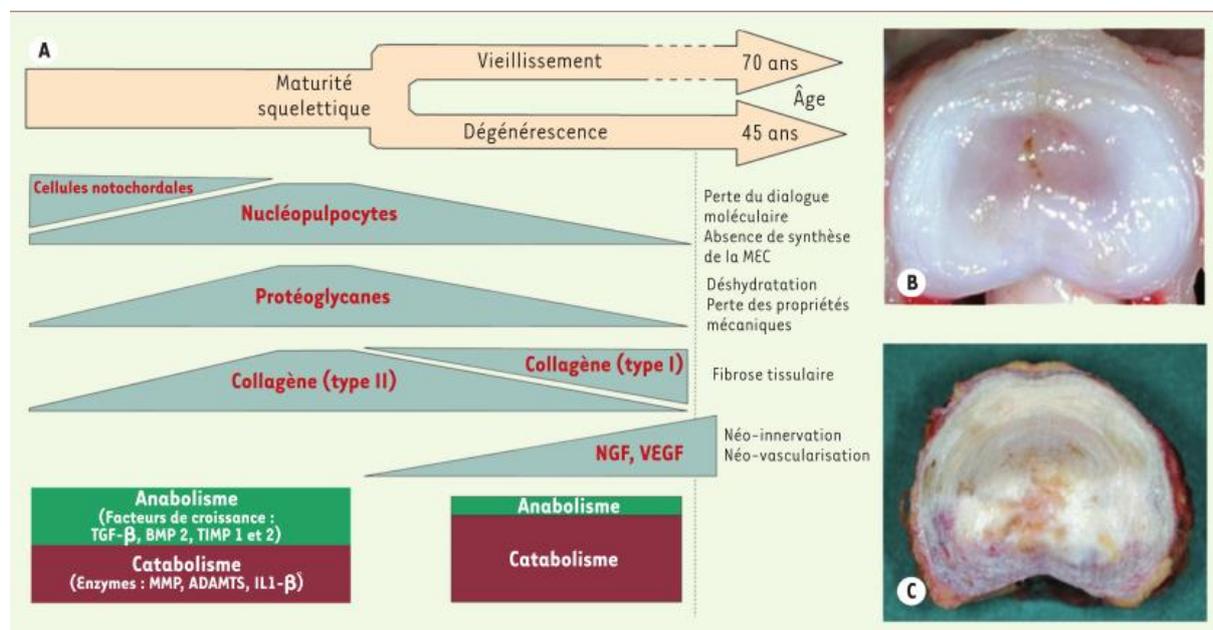


Figure 19. La dégénérescence discale (2). (A) Représentation schématique de l'évolution des composants du DIV au cours de la dégénérescence discale. (B) Vue macroscopique d'un DIV sain (hautement hydraté). (C) Vue macroscopique d'un DIV dégénéré (déshydraté et fibrotique).

MEC : matrice extracellulaire ; DIV : disque intervertébral ; NGF : nerve growth factor ; VEGF : vascular endothelial growth factor ; TGF- β : transforming growth factor-b ; BMP2 : bone morphogenic protein 2 ; TIMP1-2 : tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2 ; MMP : matrix metalloproteinase ; ADAMTS : a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs ; IL1- β : interleukine 1- β .

2. Des traitements conservateurs à la médecine régénérative du DIV

La prise en charge des lombalgies consiste dans un premier temps en des traitements conservateurs basés sur le **repos** et l'administration de **traitements pharmacologiques** (anti-inflammatoires, antalgiques de différents paliers, physiothérapie) (Figure 20). Lors de l'échec de ces traitements, la prise en charge des patients fait appel à des traitements chirurgicaux. Il s'agit de l'**arthrodèse**, qui consiste à la fusion de deux vertèbres après discectomie, et de l'**arthroplastie**, basé sur le remplacement prothétique du DIV (Figure 20). Qu'ils s'agissent de prise en charge pharmacologiques ou chirurgicales, ces deux approches sont à visée purement symptomatique et ne permettent pas de traiter l'origine même de la dégénérescence discale.

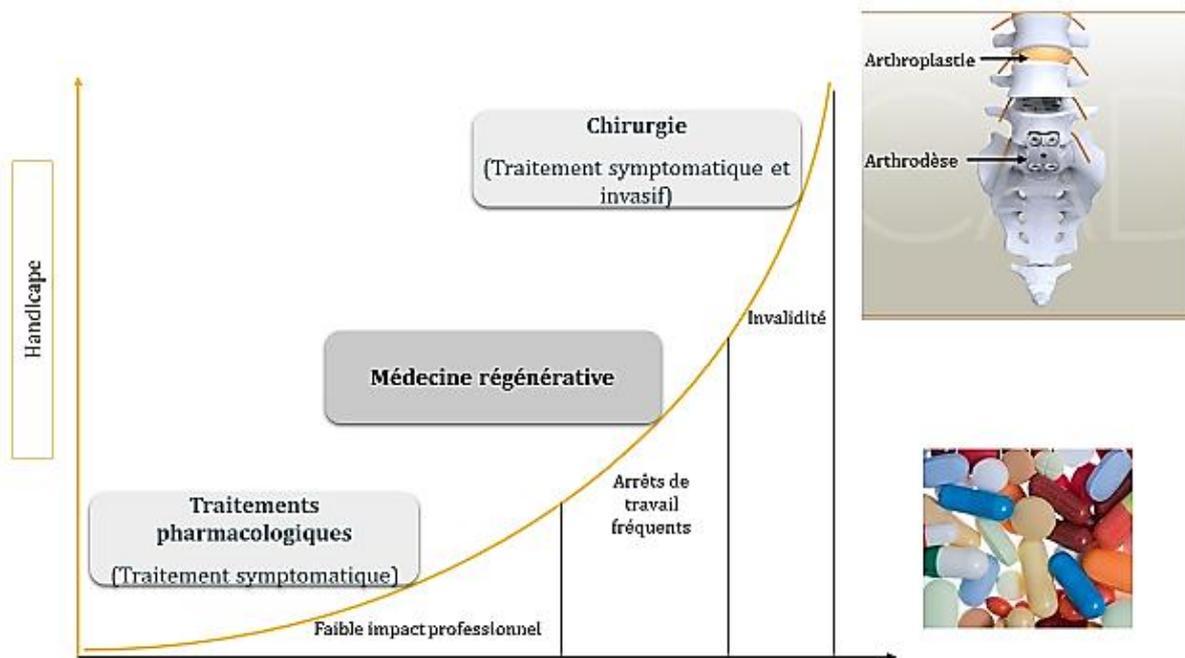


Figure 20. Les différentes approches thérapeutiques pour le traitement de la dégénérescence discale et la place potentielle de la médecine régénérative (Adapté de Clouet J., 2010 (154)).

Depuis quelques années, les connaissances acquises sur les processus menant à la dégénérescence discale ainsi que sur les propriétés des cellules souches permettent d'envisager de nouvelles approches particulièrement prometteuses de médecine régénérative. Il s'agit notamment d'inverser le processus dégénératif en procédant à une supplémentation cellulaire adaptée permettant de restaurer la MEC et ainsi la pression

hydrostatique essentielle aux contraintes biomécaniques subies par le DIV. Le NP, structure centrale du DIV, est considéré comme l'élément initiateur du processus de dégénérescence discale et de ce fait constitue une cible privilégiée.

Comme évoqué dans la première partie de ce manuscrit, deux approches se prêtent particulièrement au traitement de cette pathologie au regard de l'origine multifactoriel de la dégénérescence discale.

La **thérapie cellulaire** a pour objectif de suppléer le NP en cellules régénératives capables de néo-synthétiser la MEC du DIV (2,4). Plusieurs sources cellulaires sont envisageables (cellules du NP issues de DIV herniés, chondrocytes articulaires, iPS, CSM). Cependant l'utilisation de CSM allogéniques semble être le plus pertinent (2) au vu des différentes problématiques associées aux autres types cellulaires que nous avons pu évoquer précédemment (faible quantité, signature phénotypique non adaptée, tumorigénicité, risque infectieux, coût). Des essais précliniques et cliniques de thérapies cellulaires ont permis de démontrer la capacité de cellules, notamment des CSM non différenciées, à synthétiser une MEC discale et induire cliniquement une amélioration des symptômes douloureux (2). Cependant ces essais ayant été réalisés sur un faible nombre de patients (2 et 10), il n'est pour le moment pas possible de conclure sur l'efficacité de l'utilisation des CSM. Des études complémentaires sont ainsi nécessaires, certaines sont déjà en cours (Tableau 1).

Tableau 1. Médecine régénérative du disque intervertébral : essais cliniques effectués à partir de CSM. (Adapté de Henry et al., 2014 (2) et de Henry et al., accepté en nov. 2017 (155))

Promoteur	Nature des cellules	Nbre de patients	Caractéristiques de l'étude	Phase	Numéro d'essai (Source ClinicalTrial.gov)	Statut
The Foundation for Spinal Research, Education and Humanitarian Care, Inc (Floride, Etats-Unis)	CSM autologues (stromales)	(Estimé à 100)	Observationnelle	Observationnelle	NCT02529566 (156)	En cours d'inscription
Bioheart, Inc (Floride, Etats-Unis)	CSM autologues (tissu adipeux)	16	Interventionnelle, non randomisée, multicentrique, ouverte	Non fourni	NCT02097862 (157)	Terminé (01.17)
Red de Terapia Celular (Castilla-León, Espagne)	CSM autologues (moelle osseuse)	15	Prospective, interventionnelle, non randomisée, ouverte	1/2	NCT01513694 (158)	Terminé (05.17)
RNL Bio Company Ltd. (Séoul, Corée)	CSM autologues (tissu adipeux)	8	Prospective, interventionnelle, non randomisée, ouverte	1/2	NCT01643681 (plus référencé)	Inconnu
Inbo Han (Gyeonggi-do, République de Corée)	CSM autologues (tissu adipeux)	(Estimé à 10)	Interventionnelle, ouverte	1	NCT02338271 (159)	En cours de recrutement
Red de Terapia Celular (Valladolid, Espagne)	CSM allogéniques (moelle osseuse)	24 (2x12)	Prospective, interventionnelle, randomisée, double aveugle	1/2	NCT01860417 (160)	Terminé (04.17)
Mésoblast Ltd (New-York, Etats-Unis)	CSM allogéniques (stromales)	100	Prospective, interventionnelle, randomisée, double aveugle	2	NCT01290367 (161)	Terminé (10.16)

La seconde approche, **l'ingénierie tissulaire**, pour laquelle notre choix s'est porté, a pour objectif d'associer à ces cellules un biomatériau cytoprotecteur aux propriétés mimant celles de la MEC (2,4). Parmi les biomatériaux que nous avons abordés, les hydrogels de polymères naturels se distinguent parmi les autres. Leur différentes propriétés (hydrophiles, non toxiques, bio et cytocompatibles, injectables, perméables, dégradables, biofonctionnels) leur offrent l'avantage de pouvoir s'adapter au traitement de la dégénérescence discale (2). Contrairement à la thérapie cellulaire, aucun essai clinique n'a encore été réalisé chez l'Homme, seuls des essais précliniques associant CSM indifférenciées et biomatériaux (atélocollagène, acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), collagène II/acide hyaluronique/chondroïtine) ont été effectués (162-164). Les résultats obtenus montrent la capacité de ces substituts à former une MEC cartilagineuse,

améliorant l'hydratation intra-discale. Cependant les matériels et méthodes employés étant différents il est difficile de conclure sur l'efficacité de cette méthode sans avoir au préalable défini le matériau et le type cellulaire les plus adaptés.

En parallèle de ces approches, des travaux sont menés afin de **stimuler la différenciation des cellules souches régénératives en nucléopulpecytes**. Des cocktails de molécules bioactives agissant sur les processus de différenciation sont en cours d'évaluation au sein même du laboratoire où j'ai réalisé mes travaux. Les premiers résultats ont permis de confirmer l'intérêt du GDF-5 (Growth Differentiation Factor-5) (6). Ce facteur de croissance fait également l'objet d'essais cliniques chez l'Homme (numéros d'essais cliniques NCT01124006, NCT00813813, NCT01182337, NCT01158924)(165–168) dont les résultats ne sont pour le moment pas encore communiqués. Néanmoins, le GDF-5 possède une demi-vie brève, entraînant une action de courte durée au niveau des cibles cellulaires du DIV. Afin de palier à cet inconvénient, l'encapsulation du GDF-5 représente une alternative intéressante (5). Parmi les modalités d'encapsulation, l'utilisation de microsphères polymériques de pullulane semble particulièrement prometteuse. En effet, de récents travaux ont démontrés les multiples applications envisageables de ces microparticules en tant qu'outil diagnostique en imagerie (169) ou en tant que vecteur de biomolécules permettant de favoriser la régénérescence tissulaire *in vivo* (170).

Le sujet de ce travail étant spécifiquement dédié à l'élaboration des microparticules de pullulane comme vecteurs de biomolécules, la suite de cet écrit s'attardera à décrire davantage l'hydrogel de pullulane.

3. L'hydrogel de pullulane appliqué à la médecine régénérative du DIV

3.1. Le pullulane

Ce polymère linéaire de poids moléculaire moyen de 200 kDa, a pour formule chimique $(C_{37}H_{62}O_{30})_n$.

Il est constitué d'unités de maltotriose (trioholoside de glucose) connectées entre elles par des liaisons osidiques du type α -1,6, tandis que les glucoses sont liés entre eux par des liaisons osidiques du type α -1,4 (171,172) (Figure 21).

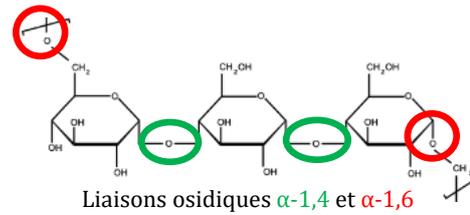


Figure 21. Structure du pullulane.

Avec cet unique motif de liaison, le pullulane sous forme d'hydrogel possède différentes propriétés physiques attractives pour son utilisation en tant que biomatériau telles que : la flexibilité, une habilité à adhérer, la capacité à former des fibres et de minces films (171,173). Le pullulane étant un polysaccharide naturel, il possède toutes les propriétés requises pour notre application. Il est hydrophile ce qui lui offre une similarité structurelle en tant que réseau hydraté avec les protéoglycanes de la MEC et justifie son utilisation pour la régénérescence du DIV. Il est neutre, biodégradable, biocompatible, non immunogénique et non toxique (174,175).

La première commercialisation du pullulane fut réalisée en 1959 par la société Hayashibara à Okayama, Japon (171,174). Il se présente sous forme de poudre blanche, inodore, sans saveur, soluble dans l'eau et imperméable à l'oxygène. En solution aqueuse on obtient un produit collant et visqueux.

A ce jour, le pullulane est utilisé dans de nombreuses applications, notamment dans :

- l'industrie agro-alimentaire, comme agent d'enrobage, épaississant, stabilisant, ou encore comme emballage alimentaire imperméable au dioxygène évitant l'oxydation et maintenant l'arôme, la saveur et la fraîcheur des produits (171,176)
- l'industrie générale en entrant dans la composition de colles ou d'adhésifs, de matières plastiques ou encore de films étirables (171,176)
- l'industrie pharmaceutique, en tant qu'agent enrobant pour des gélules (Capsugel®, Plantacaps), nano ou microparticules libératrices de molécules bioactives, agent de conjugaison dans la composition de vaccins, support pour le ciblage de molécules bioactives ou pour la libération de gènes ou encore dans l'imagerie (171,176,177).
- la recherche médicale, comme polymère bioactif pour la libération de molécules en médecine régénérative (Ex: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF) (178).

3.2. Les microsphères de pullulane par émulsion/réticulation avec le trimétaphosphate de sodium

Grâce à cette technique, des particules pleines (sphères) hydrophiles, de l'ordre du micromètre (microsphères) sont obtenues. Leur taille dépend de plusieurs facteurs notamment du poids moléculaire du polymère (le pullulane) et de la viscosité de la phase huileuse (179). L'avantage de cette technique est qu'elle est simple à mettre en œuvre, rapide et peu coûteuse (179).

Comme déjà évoqué (Cf revue bibliographique II.2.1), la réticulation correspond à la formation d'un réseau macromoléculaire tridimensionnel par la formation de liaisons entre les chaînes de polymères. Ce phénomène vient solidifier les gouttelettes formées par émulsion E/H (Cf. Revue bibliographique II.3.2.2.). Les microsphères alors obtenues par émulsion/réticulation peuvent être chargées en principe actif et permettent une libération contrôlée de celui-ci. Elles protègent le principe actif et facilitent le ciblage de l'organe à atteindre (131). A ce jour, de nombreuses molécules actives sont délivrées par l'intermédiaire de microsphères.

Dans notre cas, nous avons procédé à une réticulation par réaction chimique. Cette dernière résulte de la réticulation de polymères de faible poids moléculaire, sous l'effet de la chaleur et en présence d'un catalyseur, l'agent de réticulation.

Parmi les agents de réticulation utilisés afin de réaliser cette réaction chimique un certain nombre sont toxiques (glutaraldéhyde, oxychlorure de phosphore (POCl_3), les polyépoxydes ou les isocyanates) (180).

Pour la réalisation de ces travaux, nous nous sommes axés vers l'emploi du STMP. Non toxique pour l'homme et biocompatible, il est déjà utilisé dans plusieurs applications biomédicales, biotechnologiques et pharmaceutiques (175). Utilisé pour réticuler les amidons alimentaires aux Etats-Unis, il intervient en tant qu'agent de réticulation lors de la préparation des hydrogels de pullulane réticulés (181).

Le STMP est une molécule cyclique possédant trois phosphores (Figure 22) de formule chimique $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$. Il est obtenu par la condensation d'un acide phosphorique avec un pyrophosphate à haute température. A température ambiante et en milieu basique,

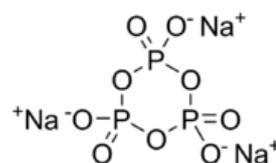


Figure 22. Structure de l'agent réticulant STMP.

sous l'action d'un alcoolate (Figure 23 a), le cycle du STMP s'ouvre (Figure 23 b) (181) et permet d'établir des liaisons au niveau des groupes hydroxyles des chaînes du polysaccharide (le pullulane) (Figure 23 c) (181). La présence de ces domaines hydrophiles permet au réseau de se gorger d'eau formant un hydrogel.

Cette réticulation peut être intermoléculaire ou intramoléculaire mais peut également donner lieu à un phosphore monolié (182). Il apparaît cependant que les liaisons sont en grande majorité des monophosphates intermoléculaires (Figure 23 c) (181). En raison de l'évolution rapide du pH au cours de la réticulation, celle-ci est immédiatement suivie par la dégradation du STMP au contact de la soude (Figure 23 c) (181). Le STMP ne réagissant pas avec les groupes carboxyliques libres, des modifications ultérieures restent possibles.

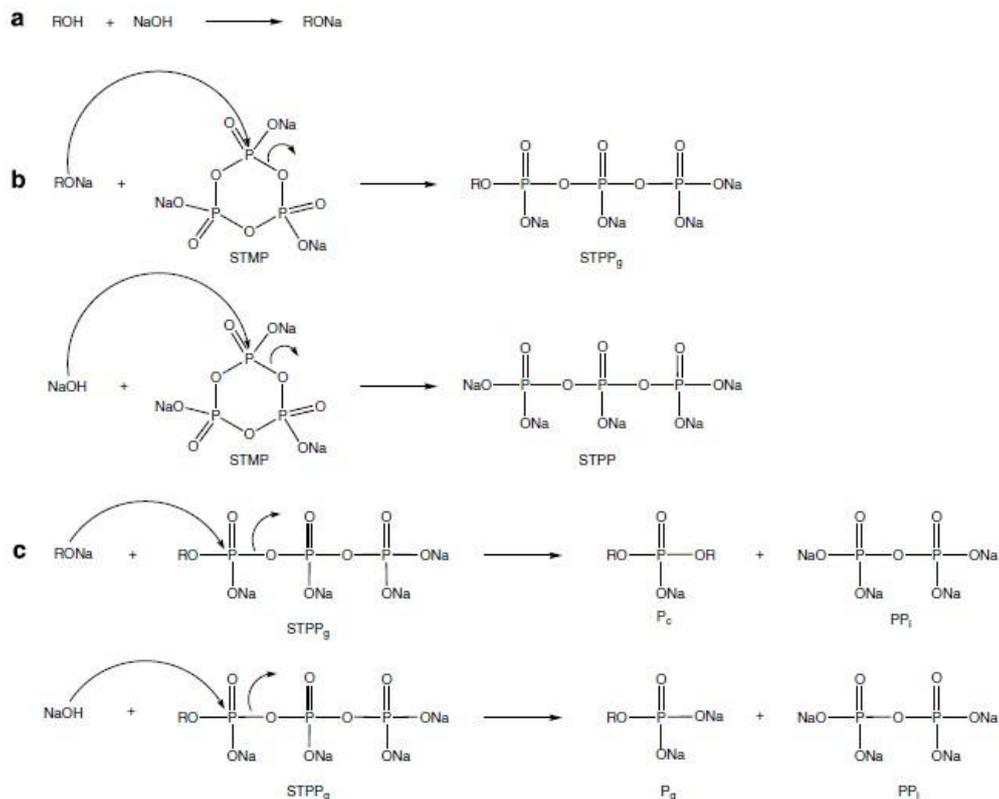


Figure 23. Réticulation d'un polysaccharide (181) (de formule générale R-OH) par du STMP en milieu basique (Soude, NaOH). (a) Formation d'un alcoolate, (b) Ouverture du STMP, (c) Réticulation ou dégradation du tripolyphosphate de sodium (STPP_g).

4. Stratégie élaborée pour le traitement de la dégénérescence discale.

Une fois dressé l'état de l'art, nous avons les éléments pour orienter notre stratégie dans la conception de molécules actives adaptées à l'application visée.

Pour toutes les raisons évoquées précédemment (Cf. Revue bibliographique III.3.), nous avons choisi d'utiliser le pullulane sous forme d'hydrogel pour réaliser des microparticules (de type microsphères) biologiquement actives. Parmi les méthodes d'obtention que nous avons pu citer (Cf. Revue bibliographique II.3.2) nous avons opté pour la méthode d'émulsion/réticulation chimique eau dans huile faisant intervenir comme agent de réticulation, le STMP. Cette technique de l'émulsion simple a d'ores et déjà été validée afin de développer des microsphères de pullulane/dextrane (169,170). Nous l'avons donc appliquée à l'obtention de PMBs. Cette méthode qui consiste à mélanger intimement deux substances liquides non miscibles, fait intervenir dans notre cas une émulsion eau dans huile (E/H) mettant en œuvre la dispersion d'une solution de pullulane aqueuse (en présence de soude et de STMP) en fines gouttelettes dans l'huile de colza sous agitation pour former une émulsion homogène.

L'objectif de mon travail a été d'optimiser le protocole de formulation de microsphères de pullulane à partir d'un protocole de formulation préalablement établi basé sur une méthode d'émulsion/réticulation. En effet, le protocole établit donnait une distribution de la population de microsphères peu homogène. De ce fait, mon objectif a été de définir les conditions opératoires optimales : vitesse d'agitation, quantités de pullulane et de STMP, température de réticulation et d'émulsion, taille de l'agitateur et du bécher et quantité d'agent réticulant afin d'obtenir une distribution de la population de microsphères homogènes. L'influence des modifications de ces paramètres sur la taille et la morphologie des microsphères a été évaluée afin de garantir leur aptitude à être injectées en intra-discale et à être chargées en facteur de croissance. Les microsphères ont également été caractérisées en termes de rendement, taux de réticulation, taux d'hydratation, taux de gonflement et résistance à la compression afin d'en connaître les propriétés physico-chimiques et biomécaniques.

En parallèle, afin de véhiculer les cellules souches et le système de libération du GDF-5 sous forme de PMBs, un hydrogel d'hydroxypropylmethylcellulose-silanisée (HPMC-Si) a également été développé au laboratoire (7). Ce biomatériau semble parfaitement adapté à l'application visée puisque, composé à 98 % d'eau, il permettrait de restaurer immédiatement l'hydratation du NP. De plus, des études ont d'ores déjà démontré la pertinence de son utilisation en médecine régénérative du cartilage articulaire et pour le traitement de l'infarctus du myocarde (117,183,184).

En résumé, l'approche développée par le laboratoire serait basée sur l'injection d'un substitut composite associant des cellules souches aux propriétés régénératives (CSM→CSA), véhiculées par une matrice d'hydrogel d'HPMC-Si, associé à des PMBs chargées en GDF-5 (Figure 24). Ainsi le GDF-5 libéré permettra d'orienter la différenciation des CSM (plus particulièrement les CSA) *in situ* en nucléopulpecytes capables de synthétiser une MEC adaptée.

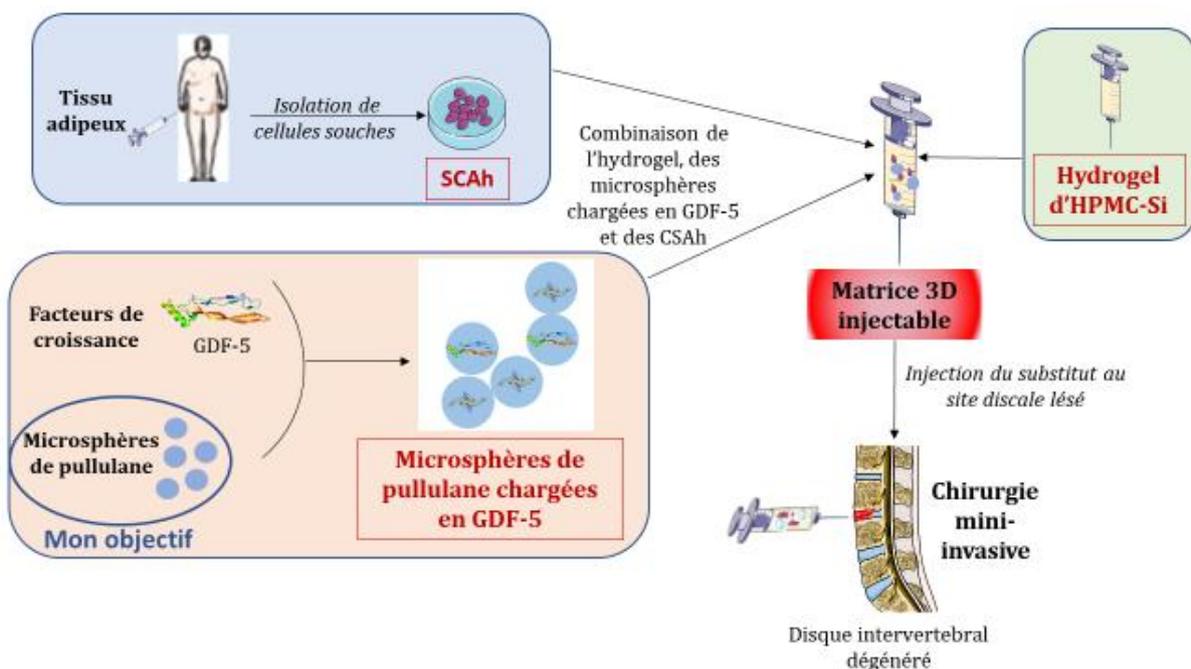


Figure 24. Stratégie de médecine régénérative du disque intervertébral adoptée par l'unité INSERM U1229-RMeS et la place de mon projet expérimental.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. PRÉSENTATION DU PROJET EXPÉRIMENTAL – OBJECTIFS TECHNIQUES ET STRATÉGIE DE TRAVAIL

Dans la première partie de ce manuscrit, le bilan fait sur la médecine régénérative et plus particulièrement sur l'ingénierie tissulaire, nous a permis d'identifier ce concept comme étant particulièrement adapté au traitement de la dégénérescence discale et pouvant ainsi pallier au manque de traitements curatifs.

Dans le but d'associer aux cellules souches du tissu adipeux un facteur biologique leur permettant de se différencier en cellules discales, un hydrogel de pullulane réticulé sous forme microsphérique apparaît comme être un biomatériau de vectorisation intéressant.

Dans ce contexte, l'ambition de ces travaux était de mettre au point le protocole de formulation d'un nouveau matériau biologiquement actif pouvant être intégré dans un projet plus global d'ingénierie tissulaire pour le traitement de cette pathologie. L'utilisation d'un hydrogel de pullulane, injectable en intra-discale, capable d'être chargé en molécules actives et en assurant une libération contrôlée permettant la différenciation de CSAh en cellules discales, nous semble être une approche prometteuse.

Mes objectifs ont été les suivants :

- 1) Optimiser une méthode de formulation par émulsion/réticulation permettant d'obtenir des microsphères polysaccharidiques de pullulane non chargées :
 - De diamètre inférieur ou égale à 100 μm pour permettre leur injection en intra-discale via une aiguille 23 gauges (23G) usuelle.
 - Avec une distribution de taille homogène.
 - De forme régulière et non poreuse adaptée à la libération de molécules actives.
 - Biocompatibles, biodégradables, non immunogéniques et non toxiques (injection *in situ*).
- 2) Caractériser les microsphères générées afin de connaître leurs propriétés physico-chimiques et biomécaniques.
- 3) S'assurer de leur aptitude à répondre à l'application visée.

Dans un premier temps l'élaboration et la mise au point du protocole d'émulsion/réticulation qui a permis de répondre à notre premier objectif sera décrit. Les différentes méthodes de caractérisation employées pour décrire au mieux les propriétés des microsphères obtenues seront ensuite détaillées. Puis, le comportement des

microsphères au sein de la matrice 3D d'HPMC-Si et leur capacité à être injectées en intradiscale seront présentés. L'encapsulation de facteur de croissance dans les microsphères optimisées et les tests d'efficacité d'approche choisie *in vitro* et *in vivo* constituent les perspectives de ce travail.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels

L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, ≥ 90 %) ; le triméthaphosphate de sodium (STMP, ≥ 95 %) ; l'huile de colza ; le sodium dodécyl sulfate (SDS, $\geq 98,5$ %) ; l'albumine sérique bovine (BSA, ≥ 96 %), l'acide de vanadate d'ammonium (99 %) ; le molybdate d'ammonium (≥ 99 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). L'hydroxyde de sodium (NaOH, ≥ 99 %) ; le chlorure de sodium (NaCl, ≥ 98 %) ; les pipettes pasteur à pointe fine (\emptyset interne 300 $\mu\text{m} \approx 23\text{G}$) proviennent de chez VWR (Louvain, Belgique).

L'acide nitrique à 65 % (HNO_3 , 65 %) ; le luer-lock (raccord luer PP) et l'agitateur magnétique L-73 proviennent de chez Fisher Scientific (Loughborough, Royaume-Unis). Le pullulane (poids moléculaire 200 000 g/mol) provient de chez Hayashibara Inc (Okayama, Japon).

Les seringues de 3 ml et 20 ml proviennent de chez HSW- Soft-Ject® (Tuttlingen, Allemagne).

Les aiguilles (Neolus) 18G (1,2*40 mm ; \emptyset interne 927 μm) et 23G (0,6*30 mm ; \emptyset interne 318 μm) proviennent de chez Terumo (Louvain, Belgique).

L'étamine 2*180*90 cm provient de chez Cook's Choice (Trumbull, USA)

L'étuve EG115 IR provient de chez Jouan (Winchester, USA).

La centrifugeuse 5810 R (6*85 ml ; rotor à angle fixe à haute vitesse (F 34-6-38) ; rayon = 11,5 cm) provient de chez Eppendorf (Hamburg, Allemagne).

La tubulure de transfusion VH-22-EGA (filtre nylon, \emptyset pores 200 μm ; contenance 20 ml) provient de chez CareFusion (San Diego, USA).

La tamiseuse AS400 control provient de chez Retsch (Haan Allemagne).

Le microscope à caméra numérique DFC450C provient de chez Leica (Wetzlar, Allemagne). Le granulomètre à diffraction laser Mastersizer 3000 provient de chez Malvern Technologies (Worcester, Angleterre).

Le lyophilisateur Pilpa V7.52 provient de chez Cryotec (Saint-Gély-du-Fesc, France). La balance de précision ED224S (max 220 g; d 0,1 mg) provient de chez Sartorius (GOETTINGEN, Allemagne).

Le spectromètre Victor³V provient de chez PerkinElmer Precisely (Waltham, USA).

Le pHmètre Portamess 913 Knick (Erreur de mesure pH<0,01, °C<0,3K) provient de chez ProMinent (Heidelberg Germany).

Le conductimètre LF96a provient de chez WTW (Weilheim Allemagne).

2. Méthodes

2.1. Marquage du pullulane à la fluorescéine

Au cours de la formulation, nous utilisons du pullulane marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (données non incluses). Ce marquage, qui a été réalisé avant le début de mes travaux, permet de visualiser les microsphères en microscopie à fluorescence.

2.2. Formulation des microsphères de pullulane

Les PMBs ont été formulées en adaptant un protocole de formulation de microsphères de pullulane/dextrane précédemment établi. Celui-ci faisait intervenir 4 étapes : (1) la préparation de la solution mère, (2) la réticulation des polysaccharides, (3) le lavage et le calibrage des microsphères, (4) la lyophilisation des microsphères.

La solution mère de pullulane/dextrane (3 :1) été réalisée à une concentration de 30 % (w/v) dans de l'eau désionisée. 10 g de cette solution été mélangés à 1 ml de NaOH 10M puis à 1 ml de STMP à 15 % (w/v), le tout dispersé dans 150 ml d'huile de colza sous agitation magnétique à température ambiante. Les microsphères formées étaient ensuite rincées successivement dans du PBS 10X, dans du SDS à 0,004 % puis dans du NaCl à 0,025 % avant d'être lyophilisées.

L'optimisation du protocole de formulation des microsphères de pullulane a été réalisée en faisant varier un certain nombre de ces paramètres pour obtenir la formulation finale présentée ici.

Une solution de pullulane a été réalisée à une concentration de 30 % (w/v) dans l'eau

désionisée. Une partie du pullulane utilisé (0,2 %) est marquée au FITC. La réticulation s'effectue en milieu basique (NaOH à 10 M) et en présence d'un agent réticulant (STMP à 90 % (w/v)).

Brièvement, à l'aide de seringues de 3 ml reliées par un luer-lock, 2,5 g de solution de pullulane/pullulane-FITC à 23°C sont mélangés à 250 µL de NaOH 10M (Figure 25 A et B). Une suspension de STMP (225 mg de STMP dissout dans 250 µL d'eau désionisée) est à son tour ajoutée à ce mélange (Figure 25 A et B). La préparation est alors injectée à l'aide d'une aiguille 18G placée au bout de la seringue dans 75 ml d'huile de colza à 23°C préalablement introduite dans un bécher sous agitation magnétique à 450 rotations par minute (rpm) (Figure 25 B). L'injection est réalisée en une vingtaine de secondes. Le bloc magnétique et le bécher sont alors placés à l'étuve à 37°C et sous agitation pendant 1h30.

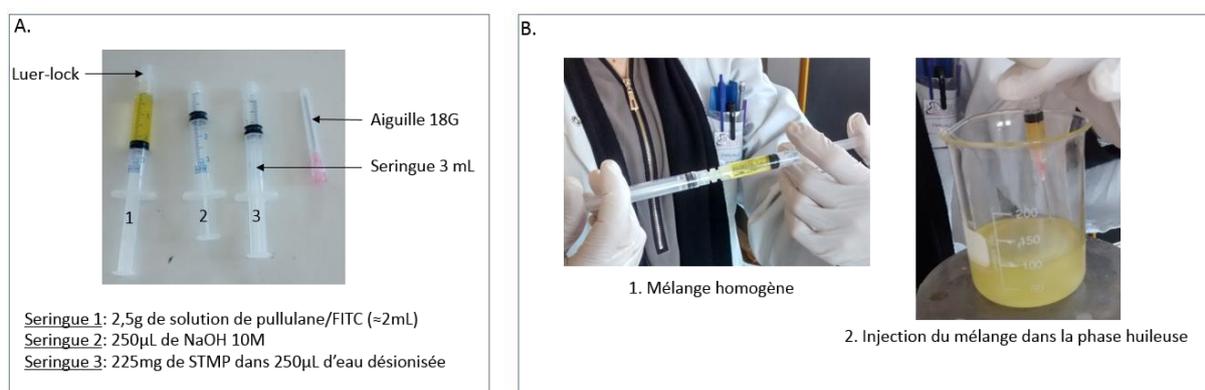


Figure 25. Formulation de microsphères de pullulane/pullulane-FITC par une méthode d'émulsion/réticulation. (A) Eléments utilisés lors de la préparation du pullulane/pullulane-FITC à disperser. (B) Mélange et injection du pullulane en phase huileuse.

Les microsphères formées sont ensuite réparties dans quatre tubes Falcon® de 50 ml, eux-mêmes complétés à 50 ml par un tampon phosphate salin concentré 10 fois (PBS 10X). Les microsphères sont alors centrifugées pendant 10 min à 3200 g (≈ 5000 rpm). La phase huileuse est éliminée et les microsphères formées sont alors récupérées dans la phase aqueuse, pour être rincées une nouvelle fois dans du PBS 10X de la même manière. Elles sont ensuite rincées en suivant le même protocole en centrifugeuse, trois fois au SDS 0,008 % suivi de trois rinçages au NaCl 0,025 %.

Les microsphères sont conservées dans une solution aqueuse de NaCl 0,025 % dans un flacon en plastique hermétique à 4°C et à l'abri de la lumière ou lyophilisées.

2.3. Séparation

Les différentes méthodes de séparation ont été expérimentées sur des PMBs préparées selon le protocole établi (Cf. Partie expérimentale II.2.2).

↳ Tamisage sur tamis en voie liquide

Le montage sur la tamiseuse est constitué de trois tamis (diamètres de 90 μm , 125 μm et 200 μm) placés en cascade reliés à un système d'entrée et de sortie d'eau. Un débit d'eau constant, ainsi qu'une agitation circulaire de 100 rpm sont appliqués au système durant 10 minutes. Les microsphères tamisées sont récupérées et conservées dans du NaCl 0,025 % à 4°C, à l'abri de la lumière avant d'être caractérisées.

↳ Tamisage sur étamine en milieu aqueux

L'étamine (dimension des pores indéterminée) est tendue sur un montage fait main (flacon plastique découpé en haut et en bas puis retourné) de façon à pouvoir déposer l'échantillon de microsphères en surface (Figure 26). Le tout est plongé dans du NaCl 0,025 % et agité manuellement.

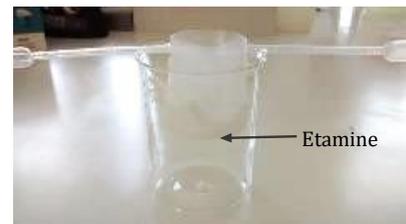


Figure 26. Montage du tamisage manuel sur étamine.

Les microsphères récupérées sont caractérisées et conservées dans du NaCl 0,025 % à 4°C, à l'abri de la lumière.

↳ Séparation en ampoule à décanter

Un volume suffisant pour atteindre une hauteur de 14 cm d'un liquide (NaCl 0,025 %, huile de colza, solution de saccharose à 10 %, solution savonneuse) est placé dans une ampoule à décanter de 250 ml (Figure 27).

L'échantillon de PMBs à séparer est déposé en surface de ce liquide à l'aide d'une seringue.

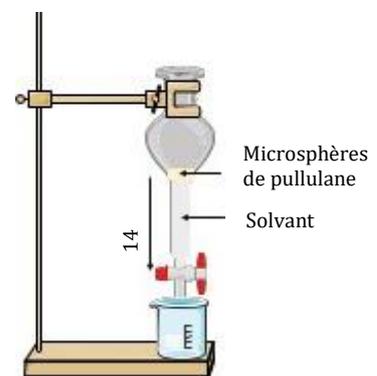


Figure 27. Montage de la séparation des microsphères de pullulane/pullulane-FITC par décantation.

Le temps nécessaire à la décantation des microsphères d'intérêt est déterminé d'après leur vitesse de sédimentation (v) qui est calculée grâce à la loi de Stokes :

$$v = \frac{2 \cdot r^2 \cdot g \Delta(\rho)}{9 \cdot \eta}$$

v : Vitesse limite de chute (m/s)

r : Rayon de la sphère (m)

g : Accélération de la pesanteur (m/s^2)

$\Delta(\rho)$: Différence de masse volumique entre la particule (kg/m^3)

η : Viscosité dynamique du fluide (Pa.s ou $kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$)

Ainsi, à l'issue de ce temps les microsphères sont récupérées dans un flacon en plastique grâce au robinet présent au bas de l'ampoule. En fonction du liquide utilisé (notamment pour l'huile, la solution de saccharose à 10 % et la solution savonneuse), les microsphères sont rincées en centrifugeuse selon le protocole de rinçage établi (Cf. Partie expérimentale II.2.2) ou bien directement conservées dans du NaCl 0,025 % à 4°C, à l'abri de la lumière avant caractérisation.

↳ Séparation par injection à travers une aiguille 18G

Les microsphères à séparer sont placées dans une seringue de 20 ml sur laquelle est fixée une aiguille 18G de diamètre interne égal à 900 μm et complétée à 20 ml avec du NaCl 0,025 %. Elles sont alors poussées dans la seringue et celles qui sont éjectées sont récupérées dans un flacon plastique, conservées dans du NaCl 0,025 % à 4°C, à l'abri de la lumière avant d'être caractérisées.

↳ Séparation par aspiration

A l'aide d'une pipette pasteur à pointe fine d'un diamètre interne de 300 μm (équivalent à celui d'une aiguille 23G), les microsphères d'un échantillon conservées dans du NaCl 0,025 % sont aspirées. Celles gênant l'aspiration par leur taille sont éliminées manuellement, celles qui sont aspirées sont réintroduites dans un flacon plastique et conservées dans du NaCl 0,025 % à 4°C, à l'abri de la lumière.

↳ Filtration en transfuseur

Après le second rinçage au SDS 0,008 % lors de la formulation des microsphères (Cf. Partie expérimentale II.2.2), celles-ci sont aspirées dans une seringue de 20 ml luer lock sur laquelle est fixée une aiguille de 18G. Elles sont alors injectées dans une tubulure de transfusion (Figure 28) pour y être filtrées. Pour cela un volume d'environ 30 ml de SDS 0,008 % est passé en trois temps dans la tubulure. Les microsphères filtrées sont alors récupérées et rincées trois fois au NaCl 0,025 % comme décrit dans le protocole de formulation (Cf. Partie expérimentale II.2.2).



Figure 28. Tubulure de transfusion.

Elles sont ensuite conservées dans du NaCl 0,025 % à 4°C, à l'abri de la lumière avant d'être caractérisées.

2.4. Caractérisation des microsphères de pullulane

2.4.1. Morphologie macroscopique

La première caractérisation réalisée est une observation au microscope à caméra numérique à fluorescence pour s'assurer que les microsphères ont bien été formées. Leur présence, leur sphéricité ainsi que la régularité de leur aspect sont contrôlées.

2.4.2. Distribution de la taille

↳ Logiciel de traitement d'image

Le logiciel de traitement d'image ImageJ (Image Processing and Analysis in Java), est utilisé afin de réaliser une estimation de la taille des microsphères à partir d'images obtenues grâce au microscope à caméra numérique. Cette analyse est établie d'après la mesure de 270 diamètres de microsphères sur trois échantillons. Leurs moyennes et les écarts-types sont calculés avec un logiciel de traitement de données (Microsoft Excel 2013).

↳ Granulométrie à diffraction laser

La distribution de la taille des microsphères est également étudiée à l'aide d'un granulomètre à diffraction laser. L'analyse est réalisée en voie liquide (NaCl 0,025 %, PBS

1X) et les résultats sont exprimés en fonction de la densité de volume (%). Chaque analyse est réalisée sur trois échantillons préparés avec le même protocole.

Le logiciel de traitement des données utilisées a permis d'accéder à différents paramètres :

- ✓ Dx(10) : diamètre maximal de 10 % des microsphères de l'échantillon
- ✓ Dx(50) : diamètre maximal de 50 % des microsphères de l'échantillon
- ✓ Dx(90) : diamètre maximal de 90 % des microsphères de l'échantillon
- ✓ D[4,3] : diamètre moyen des microsphères de l'échantillon pondéré par rapport au volume total occupé par l'échantillon
- ✓ D[1,0] : diamètre moyen des microsphères de l'échantillon en nombre

2.4.3. Rendement

Les microsphères formulées, filtrées sur tubulure de transfusion et caractérisées, sont lyophilisées durant 72h, selon un protocole préétabli (données non présentées ici).

Une balance de précision permet de déterminer le poids des échantillons secs.

Le rendement (Rd) est calculé selon la formule suivante :

$$Rd (\%) = \frac{\text{Masse de pullulane poudre initiale} \times 100}{\text{Masse de microsphères lyophilisées finale}}$$

2.4.4. Taux de réticulation

Pour déterminer le taux de réticulation, nous procédons au dosage colorimétrique du phosphore selon un protocole préétabli. Celui-ci fait intervenir deux réactifs de Mission : une solution de vanadate d'ammonium (NH_4VO_3) à 2,5 % dans laquelle est additionné de l'acide nitrique (HNO_3) (solution A) et une solution de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) à 50 % (solution B). Deux solutions d'acide phosphorique (H_3PO_4) à 0,4 mM et 0,8 mM sont également préparées. A partir de ces différentes solutions, la gamme étalon « équivalent phosphate » est réalisée et les échantillons sont traités.

Cette caractérisation a été effectuée à la fois sur des microsphères et sur des matrices afin de comparer le taux de réticulation sur ces deux types de mises en forme.

Les matrices sont préparées à partir du même mélange que celui utilisé pour la formulation des microsphères (Cf. Partie expérimentale II.2.2). Le mélange est coulé entre

deux plaques de verre séparées par un pochoir de silicone (80*60*1 mm) et maintenues en place à l'aide d'un aimant (Figure 29 A, B, C et D). L'ensemble est placé à l'étuve à 37°C durant 1h30.

Après réticulation, une découpe de la plaque de gel avec un emporte-pièce de 6 mm de diamètre, permet d'obtenir des matrices (Figure 29 E). Elles sont aussitôt placées dans un cristalliseur et rincées dans un bain de PBS 10X (Figure 29 F). Leur neutralisation est vérifiée à l'aide d'un pH-mètre par mesure du pH du milieu de rinçage. Lorsque le pH 7,4 est atteint, un rinçage au NaCl 0,025 % est réalisé de la même manière. Une mesure de la conductivité est effectuée pour contrôler cette étape.

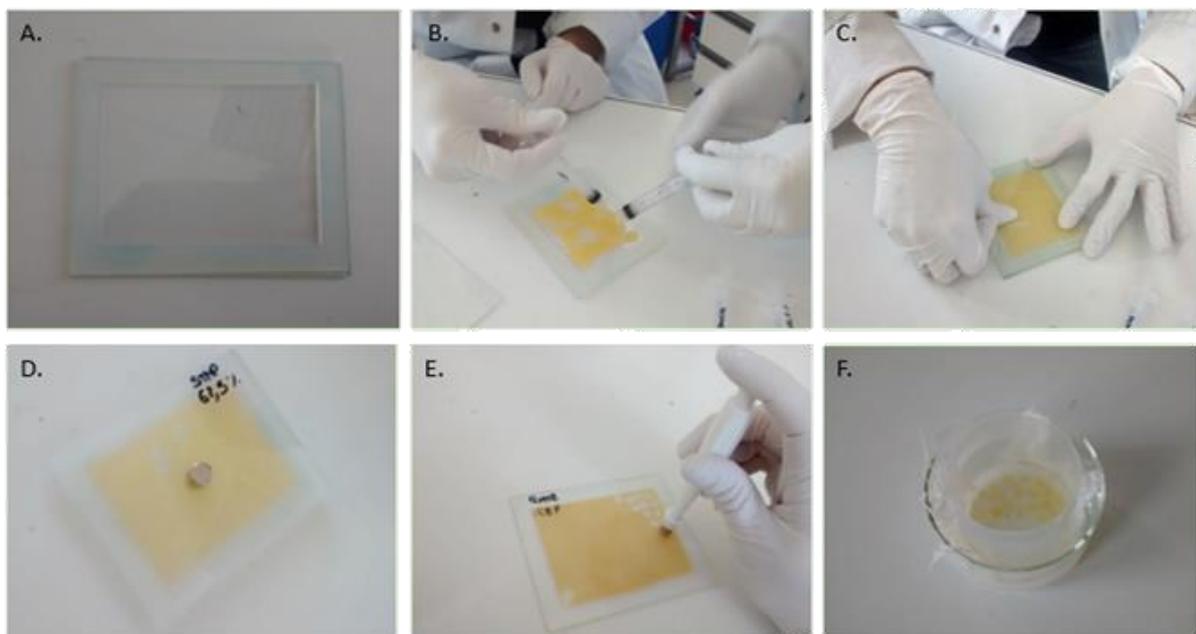


Figure 29. Préparation de matrices de pullulane/pullulane-FITC/NaOH /STMP. (A) Pochoir de silicone posé sur une plaques de verre. (B) Préparation de pullulane/pullulane-FITC/NaOH/STMP coulée sur le montage. (C) Application de la seconde plaque de verre sur le montage. (D) Maintien du montage par des aimants avant mise à l'étuve. (E) Poinçonnage du gel réticulé pour former les matrices après mise à l'étuve. (F) Rinçage des matrices dans un bain de PBS 10X puis dans du NaCl 0,025 %.

Le taux de réticulation a été réalisé en triplicat sur dix échantillons :

- témoin vide
- poudre de pullulane
- matrices de pullulane à 25 %, 37,5 %, 50 %, 62,5 %, 75 % et 87,5 % (w/w) de STMP
- microsphères de pullulane à 25 %, 37,5 % (w/w) de STMP

Préalablement, une hydrolyse acide des échantillons avec une solution d'acide nitrique (diluée à 10 % v/v) est effectuée durant 4h à l'étuve à 100°C. Ces hydrolysats sont ensuite traités avec les solutions A et B préalablement préparées. En parallèle, la gamme étalon est également préparée en ajoutant successivement de l'eau, de l'acide nitrique, l'acide phosphorique à 0,4 mM ou 0,8 mM, la solution A et la solution B dans des volumes différents (non indiqués ici). Dans une plaque 96 puits, 225 µL de chaque solution à doser sont déposés. L'absorbance est mesurée à 405nm à l'aide d'un spectromètre.

D'autre part, le taux de réticulation qui consiste à doser le phosphate est également utile pour évaluer l'efficacité d'incorporation (EI) du phosphore. Pour ce faire, nous procédons au calcul suivant :

$$EI (\%) = (C^{\circ}(P)_{max} - C^{\circ}(P)_{mesurée}) * 100$$

2.4.5. Taux d'hydratation

L'étude du taux d'hydratation est réalisée sur des matrices de pullulane/pullulane-FITC (Cf. Partie expérimentale II.2.4.4).

Une fois rincées, cinq matrices sont pesées à la balance de précision puis mises à sécher à l'étuve à 37°C pendant 48h. Elles sont alors de nouveau pesées.

Le taux d'hydratation (TH) est calculé d'après la formule suivante :

$$TH (\%) = \frac{\text{Masse matrice hydratée} - \text{Masse matrice sèche} \times 100}{\text{Masse matrice hydratée}}$$

2.4.6. Taux de gonflement

Cette analyse est également réalisée sur des matrices préparées tel que décrit dans la précédemment (Cf. Partie expérimentale II.2.4.4).

Une fois rincées, les matrices sont lyophilisées selon le même protocole que pour les microsphères durant 72h (Données non présentées ici).

Cinq matrices lyophilisées sont pesées sur la balance de précision puis réhydratées dans du PBS 1X en excès. Elles sont alors pesées à des temps déterminés (toutes les 30 minutes pendant 2 heures puis à 24h et 48h) jusqu'à ce que la masse se stabilise en prenant soin au préalable de les essuyer sur du papier absorbant doux afin de retirer l'excédent d'eau.

Le taux de gonflement (Q) est obtenu d'après la formule suivante :

$$Q (\%) = \frac{\text{Masse matrice gonflée} - \text{Masse matrices sèche} \times 100}{\text{Masse matrice sèche}}$$

2.4.7. Test de résistance à la compression

La dernière caractérisation effectuée sur les microsphères de pullulane/pullulane-FITC est l'analyse de la force de résistance à la compression. Un échantillon de microsphères préparé selon le protocole de formulation établi (Cf. Partie expérimentale II.2.2) a été envoyé à la société CellScale Biomaterials Testing (Waterloo, Canada). Cette société a pris en charge la réalisation du test de compression grâce au MicroSquisher de leur société. L'analyse est conduite à température ambiante, en milieu aqueux, sur trois microsphères de taille d'environ 150 µm de diamètre. Une compression égale à 25 % du diamètre initial de la sphère est appliquée sur chaque microsphère durant 30 secondes suivies de 30 secondes de relâchement. Le module de Young (E), qui rend compte de l'élasticité, est calculé grâce aux valeurs obtenues d'après la formule :

$$E \text{ (Pa)} = \frac{\text{Contrainte (Stress)}}{\text{Déformation (Strain)}} = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

2.5. Contrôle de l'aptitude à répondre à l'application visée

2.5.1. Distribution de la taille des microsphères avant et après lyophilisation en fonction du solvant d'hydratation

Trois lots de microsphères sont préparés (Cf. Partie expérimentale II.2.2) puis lyophilisés selon le protocole établi (données non présentées ici).

Les microsphères sont alors réhydratées soit dans du NaCl 0,025 % soit dans du PBS 1X (solvant d'hydratation de facteurs biologiques qui sera associé au GDF-5).

Leur morphologie est contrôlée au microscope à fluorescence et leur distribution de taille au granulomètre à diffraction laser (Cf. Partie expérimentale II.2.4.2). Les échantillons sont analysés :

- hydratés dans du NaCl 0,025 % avant lyophilisation
- réhydratés dans du NaCl 0,025 % après lyophilisation
- réhydratés dans du PBS 1X après lyophilisation

2.5.2. Association des microsphères à l'HPMC-Si et « injectabilité »

Les microsphères obtenues selon le protocole établi (Cf. Partie expérimentale II.2.2), filtrées, caractérisées et lyophilisées sont tout d'abord réhydratées. Pour ce faire 40 mg de microsphères lyophilisées sont placées dans une seringue de 3 ml avec une quantité

suffisante de PBS 1X, soit 250 μ L durant 30 minutes.

D'autre part, deux millilitres d'HPMC-Si à 3 % sont mélangés avec 1 ml de tampon acide à base d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane), en seringue 3 ml avec luer-lock pour obtenir un hydrogel à 1,85 % (w/v).

Les microsphères réhydratées sont alors intégrées au mélange grâce à l'association des deux seringues via un luer-lock. L'ensemble est correctement homogénéisé avant de laisser réticuler en seringue durant 15 minutes.

Le mélange est déposé dans des plaques 12 puits et 24 puits :

- ✓ 1,5 ml sont déposés sans aiguille dans un puits de la plaque 24 puits
 - ✓ 1,5 ml sont déposés avec une aiguille 23G dans un puits de la même plaque (Figure 30)
 - ✓ 0,1 ml sont déposés sans aiguille dans un puits de la plaque 12 puits
 - ✓ 0,1 ml sont déposés avec une aiguille 23G dans un puits de cette seconde plaque
- Les deux plaques sont alors mises à l'étuve à 37°C pour 48h de réticulation.

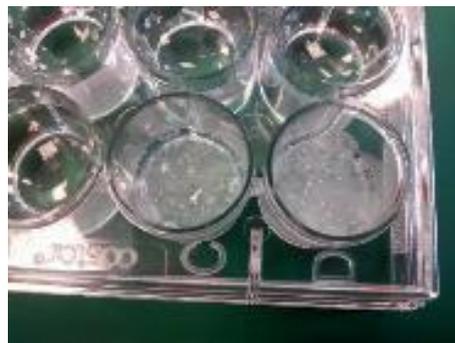


Figure 30. Gel d'HPMC-Si à 1,85 % associé aux microsphères de pullulane dans deux puits d'une plaque 24 puits.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Optimisation de la formulation des microsphères de pullulane

L'application visée consiste en l'injection percutanée (chirurgie mini-invasive) de PMBs en intra-discale. L'injection nécessite une aiguille d'un diamètre interne de 23 G soit environ 300 μ m. Afin de garantir leur injectabilité, les microsphères doivent présenter un diamètre d'environ 100 μ m.

La formulation des PMBs a été optimisée à partir d'un protocole préalablement établi au laboratoire basé sur une approche émulsion/réticulation chimique. Néanmoins la population de microsphères était peu homogène. Dans ce contexte, mon objectif a été de définir les conditions opératoires optimales afin d'obtenir une distribution de la population de microsphères homogène. Pour cela, différentes conditions ont été testées : vitesse d'agitation, quantités de pullulane et de STMP, températures, taille de l'agitateur et du bécher, quantité d'agent réticulant.

L'influence des modifications de ces paramètres sur la taille et la morphologie des microsphères a été évaluée.

1.1. Influence de la vitesse d'agitation

Différentes vitesses d'agitation d'émulsion ont été testées : 250, 350, 450, 550 et 650 rpm. L'observation au microscope à fluorescence a permis d'éliminer les formulations réalisées à 250, 550 et 650 rpm en raison de leurs irrégularités morphologiques (Figure 31 A, B et C). En revanche, les préparations obtenues sous agitation à 350 et 450 rpm forment des microsphères sphériques et régulières (Figure 32 A et B). L'analyse au granulomètre à diffraction laser montre une polydispersion dans les deux conditions. De plus, elle rend compte d'une double population de microsphères. Une première population avec un pic situé à environ 20 μm et une seconde population dont le pic est à 300 μm pour la formulation obtenue à 450 rpm et un pic à 500 μm pour celle réalisée à 350 rpm (Figure 32 A et B).

Cependant, les microsphères formulées sous 450 rpm d'agitation présentent un diamètre moyen exprimé en volume [D4,3], inférieur à celles formulées sous 350 rpm d'agitation (Figure 32 A et B).

En conséquence, l'optimisation de la formulation a été poursuivie en utilisant une vitesse d'émulsion de 450 rpm.



Figure 31. Aspect morphologique de microsphères de pullulane/pullulane-FITC observées au microscope à fluorescence. (A) Microsphères préparées sous agitation magnétique de 250 rpm. (B) Microsphères préparées sous agitation magnétique de 550 rpm. (C) Microsphères préparées sous agitation magnétique de 650 rpm.

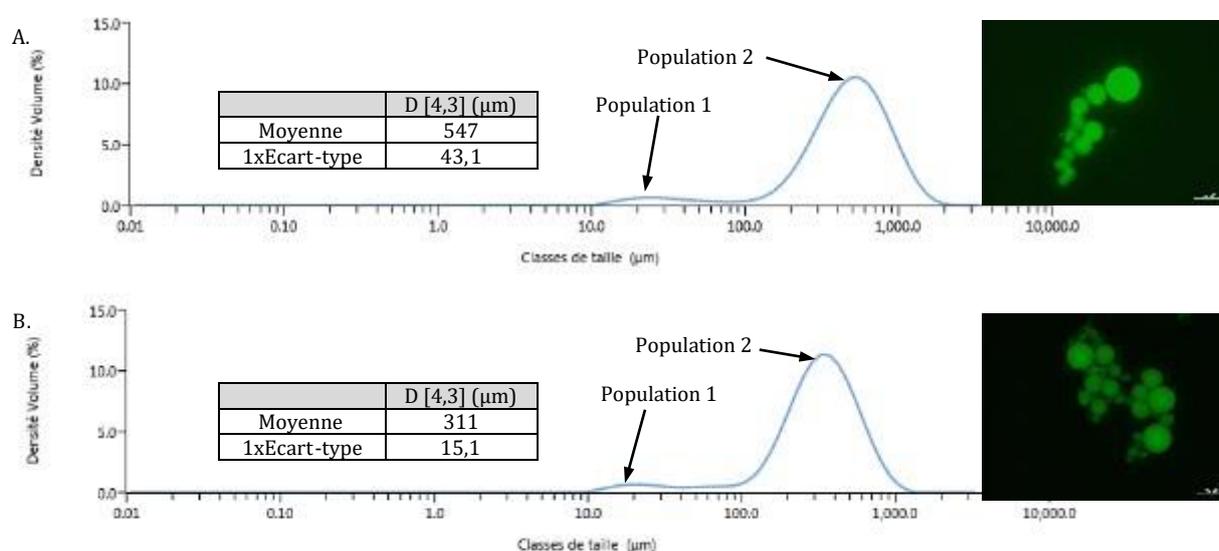


Figure 32. Distribution de la taille et aspect morphologique des microsphères de pullulane préparées sous agitation magnétique à (A) 350 rpm et (B) 450 rpm.

1.2. Influence de la quantité de pullulane dispersé

Des injections de 0,5, 1, 2,5 et 5 g de la solution de pullulane ont été effectuées. L'analyse granulométrique par diffraction laser n'a pas permis d'établir de différence significative de la taille des microsphères (Figure 33 A). En revanche, l'observation au microscope à fluorescence démontre l'existence de déformations des microsphères dans les conditions 0,5 et 1 g de préparation de pullulane dispersée (Figure 33 B et C). Ces deux conditions ont donc été éliminées. L'aspect morphologique des microsphères dans les conditions 2,5 et 5 g de solutions de pullulane est quant à lui régulier (Figure 33 D et E). Dans ce contexte, et au regard de la plus grande maniabilité lors de la manipulation, la condition 2,5 g a été retenue pour les investigations complémentaires.

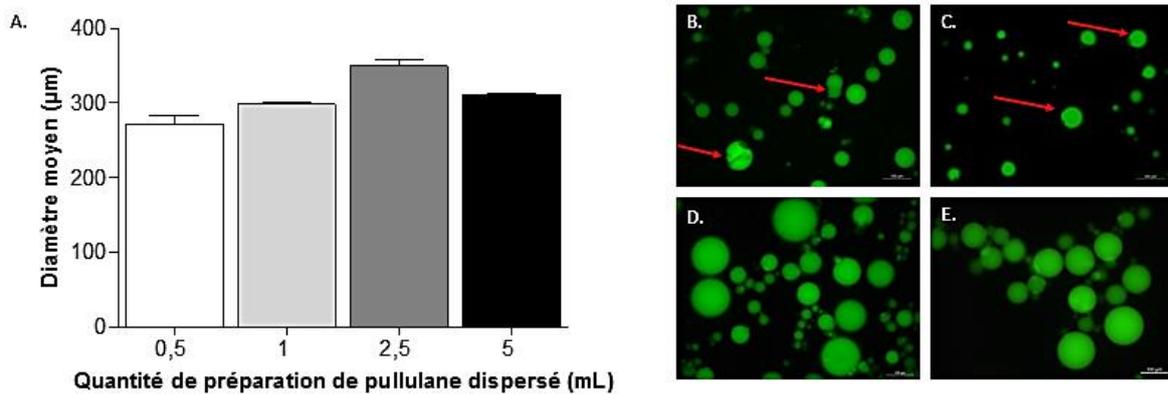


Figure 33. (A) Histogramme du diamètre moyen des microsphères de pullulane en volume (D [4,3]) en fonction de la quantité de solution de pullulane dispersée. Valeurs moyennes +/- SEM (n=3). Aspect morphologique des microsphères formulées avec (B) 0,5 g de solution de pullulane dispersée. (C) 1 g de solution de pullulane dispersée. (D) 2,5 g de solution de pullulane dispersée. (E) 5 g de solution de pullulane dispersée.

1.3. Influence de la température, de la taille de l'agitateur et du bécher, de la quantité d'agent réticulant

L'influence de la température de réticulation (à l'étuve à 37°C ou 50°C), de la température du pullulane à disperser (sorti du réfrigérateur à 4°C, ramené à température ambiante à 23°C ou chauffé à 50°C), de la température de l'huile de colza (sortie du réfrigérateur à 4°C ou ramené à température ambiante à 23°C), de la taille de l'agitateur (4 cm ou 4,5 cm) et du bécher (5,5 cm de diamètre ou 6 cm), ainsi que la quantité d'agent réticulant (STMP) intégrée au mélange (25 % (w/w) et 37,5 % (w/w)) a également été étudiée. Quel que soit le paramètre, aucune variation significative de la taille des microsphères n'a été observée. Les conditions décrites dans le paragraphe « Formulation des microsphères de pullulane » (Cf. Partie expérimentale II.2.2) sont ainsi utilisées (pullulane à disperser et huile de colza à 23°C, réticulation à l'étuve à 37°C et verrerie usuelle). Cependant la formulation est établie avec une quantité initiale de STMP à 37,5 % (w/w) afin de répondre aux besoins liés à la réalisation de plusieurs caractérisations (Cf. Partie expérimentale II.2.4).

Ainsi, en raison des résultats obtenus et en l'absence de modifications sur la distribution de la taille des microsphères, les méthodes de séparation des deux populations de microsphères est entreprise pour ne conserver que celles d'intérêt.

2. Optimisation de la séparation des microsphères de pullulane

Les analyses en granulométrie à diffraction laser rendent compte d'une double population de microsphères (Figure 34 A), une avec un pic situé à 30 μm et une autre dont le pic est à 300 μm .

L'analyse menée se base sur la valeur du D[4,3] (diamètre moyen des microsphères de l'échantillon pondéré par rapport au volume total occupé par l'échantillon) et tient compte de la valeur du Dx correspondant au pourcentage de l'échantillon contenant les microsphères dont le diamètre maximal est de 100 μm . Après analyse des données brutes du graphique (données présentées ici), il est établi que les microsphères d'intérêt représentent 20 % du volume total d'un échantillon (Figure 34 A et B).

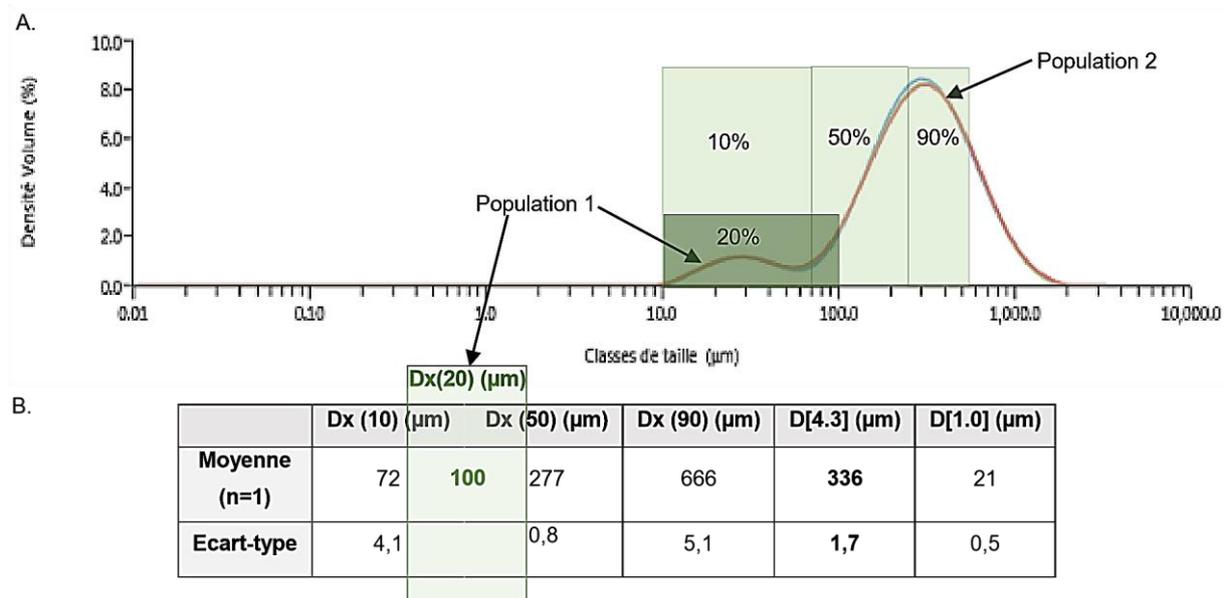


Figure 34. Données obtenues par granulométrie à diffraction laser sur un échantillon de microsphères préparées selon le protocole établi (Cf. Partie expérimentale II.2.2.). (A) Courbe de la distribution de la taille des microsphères de pullulane/pullulane-FITC en densité de volume. (B) Tableau récapitulatif des données obtenues exprimées en pourcentage de volume.

La comparaison du D[4.3] et du D[1.0] met en évidence une différence entre le diamètre moyen des microsphères de l'échantillon (21 μm) et celui occupé par celles-ci en volume (336 μm) (Figure 34 B). Cette différence est due à la polydispersité de l'échantillon. En effet, bien que les plus grosses microsphères soient moins nombreuses (d'où un D[1.0]=21 μm), elles représentent un volume largement supérieur à celui des plus petites (le volume d'une microsphère de 10 μm^3 est égal au volume de 1000 microsphères de 1 μm^3) (d'où un D[4.3]=336 μm).

Pour dissocier les deux populations de microsphères plusieurs techniques ont été testées (Tableau 2).

Tableau 2. Techniques de séparation testées.

Méthodes		Solvants	Résultats
Tamissage mécanique sur tamis inox en voie liquide (Tamis 90, 125 et 200 μm)		Eau (aq)	Séparation non concluante
Tamissage manuel sur étamine en milieu aqueux		NaCl 0,025 % (aq)	Séparation effectuée autour de 200 μm
Décantation en ampoule 250 ml		NaCl 0,025 % (aq)	Séparation non concluante
		Huile de colza	Formation d'agglomérats de microsphères
		Saccharose à 10 % (aq)	Séparation non concluante
		Solution savonneuse (aq)	Séparation non concluante
Séparation par injection avec une aiguille 18G (\emptyset interne 900 μm)		NaCl 0,025 % (aq)	Réalisation impossible
Séparation par aspiration à l'aide d'une pipette pasteur à pointe fine (\emptyset interne 300 μm)		NaCl 0,025 % (aq)	Séparation non aboutie
Filtration en transfuseur doté d'un filtre en nylon (Pores 200 μm)		SDS 0,008 % (aq)	Séparation aboutie

↳ Tamissage mécanique sur tamis inox

Comme décrit précédemment, cette expérimentation est réalisée sous agitation avec un débit constant d'eau. La séparation des microsphères d'intérêt de celles ayant un diamètre supérieur à 100 μm n'a pas été possible en raison d'un colmatage sur le tamis

en inox. Cette matière semble inappropriée pour cette application et aucune microsphère n'a été récupérée sur le tamis de 90 μm .

↳ Tamisage manuel sur étamine

Un autre type de matériau, l'étamine, a été utilisé. L'analyse au granulomètre laser des microsphères restant sur l'étamine après filtration met en évidence une population constituée de microsphères dont les diamètres sont toujours hétérogènes. En revanche les microsphères filtrées présentent toutes un diamètre inférieur à 200 μm .

La présence de microsphères dont le diamètre est inférieur à 100 μm , en surface de l'étamine, indique néanmoins que les microsphères ne sont pas que partiellement séparées. Macroscopiquement, il semble que les microsphères soient collées les unes aux autres.

Cette méthode n'est donc toujours pas optimale. De plus, le diamètre des pores de l'étamine étant indéterminé, il est impossible de réaliser un tamisage contrôlé.

↳ Décantation en ampoule

Afin de palier au colmatage une séparation par décantation est réalisée. D'après la loi de Stokes, qui décrit la vitesse de sédimentation d'une particule en fonction de sa taille, le temps nécessaire à une microsphère de 100 μm pour parcourir 14 cm (distance entre la surface du liquide où sont déposés les microsphères et le bas de l'ampoule à décanter) en fonction du solvant de séparation, est calculé. Le même calcul est effectué pour des microsphères de 150 μm et 200 μm afin d'estimer le temps de chute nécessaire pour séparer les microsphères de différents diamètres. Pour cela la masse volumique des microsphères est mesurée ($1,05 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) et la viscosité dynamique de l'eau ($10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) est prise en compte.

Le premier essai a été réalisé avec pour solvant de séparation, le NaCl 0,025%. Les microsphères s'agrègent dans ce milieu ce qui empêche leur séparation et invalide cette méthode.

L'expérience a été réitérée en présence d'huile de colza. En effet, comme décrit dans la loi de Stokes, il est possible de faire varier la viscosité et la masse volumique afin d'optimiser les temps de chute des particules de différentes tailles en modifiant le solvant de séparation.

L'huile de colza étant moins dense que les microsphères mais plus visqueuse, la séparation des microsphères devrait théoriquement être meilleure (Viscosité dynamique

$7,78 \cdot 10^{-2}$ Pa.s ; Masse volumique $0,916 \text{ g.cm}^{-3}$). En pratique, les microsphères étant lipophobes, elles se sont agrégées entre elles et ont formé de gros amas. Ceux-ci ont chuté rapidement sans que les microsphères ne soient séparées. La méthode de séparation basée sur la décantation en ampoule dans l'huile de colza a donc été éliminée.

Le troisième solvant utilisé est la solution aqueuse de saccharose à 10 %. Cette solution aqueuse est à la fois moins dense que les microsphères tout en étant plus visqueuse (Viscosité dynamique $1,336 \cdot 10^{-3}$ Pa.s ; Masse volumique $1,038 \text{ g.cm}^{-3}$). L'agrégation des microsphères est toujours observée, cette expérience n'est donc pas validée.

Afin de pallier à l'agrégation des microsphères observées dans les conditions précédentes, un dernier solvant a été testé. Il s'agit d'une solution contenant un tensioactif (SDS). En présence de cette dernière il n'y a plus d'agrégation. Cependant bien qu'aucun calcul n'ait été effectué par manque de données (viscosité dynamique et masse volumique non connue) l'observation visuelle permet de conclure que le temps de chute des différentes microsphères est trop similaire pour parvenir à les séparer efficacement. La technique de décantation en ampoule dans une solution savonneuse est donc écartée. Néanmoins, les essais réalisés avec cette méthode de décantation ont permis de conclure qu'en présence de détergent (solution savonneuse) les microsphères ne s'agrègent plus. Ainsi, une solution de SDS 0,008 % sera utilisée pour les expérimentations ultérieures.

↳ Séparation par injection avec une aiguille 18G

Cette séparation consiste à faire passer les microsphères au travers d'une aiguille 18G afin de laisser sortir uniquement celles dont le diamètre le permet (\emptyset interne de l'aiguille 18G = $900 \mu\text{m}$). Cette méthode extrêmement fastidieuse n'a pas été concluante en raison du colmatage trop rapide des microsphères à l'extrémité de l'aiguille.

↳ Séparation par aspiration à l'aide d'une pipette pasteur à pointe fine

La séparation est testée par aspiration des microsphères d'un échantillon à l'aide d'une pipette pasteur à pointe fine (\emptyset interne = $300 \mu\text{m}$). Celles qui ne sont pas aspirées et qui restent donc à l'entrée de la pointe, sont retirées manuellement. Cette technique s'avère efficace mais reste fastidieuse au vu de la quantité de microsphères à séparer.

↳ Séparation en transfuseur doté d'un filtre en nylon

Le transfuseur utilisé possède un filtre de nylon dont les pores présentent un diamètre de $200 \mu\text{m}$. Une filtration est effectuée en présence d'un détergent, le SDS 0,008 % afin

d'éviter l'agrégation des microsphères. Le résultat de cette méthode est concluant sur une petite fraction d'un échantillon. En effet, la séparation d'un échantillon complet ne peut être réalisée en raison du trop petit volume du réservoir du transfuseur. Le fractionnement d'un échantillon en quatre permet ainsi d'éliminer le colmatage sur le filtre. L'analyse granulométrique par diffraction laser montre le passage d'une population de microsphères initialement hétérogène (Figure 35 A et A') à une population dont le diamètre moyen des microsphères est de 129 μm (Figure 35 C et C'). Les microsphères restées en surface du filtre (Figure 35 B et B') possèdent quant à elles un diamètre moyen de 500 μm . Cette méthode permet donc de séparer les microsphères d'intérêt de celles ayant un diamètre trop important (Figure 35 D). Facile à mettre en œuvre, l'utilisation d'un transfuseur a donc été retenue et intégrée au protocole de formulation.

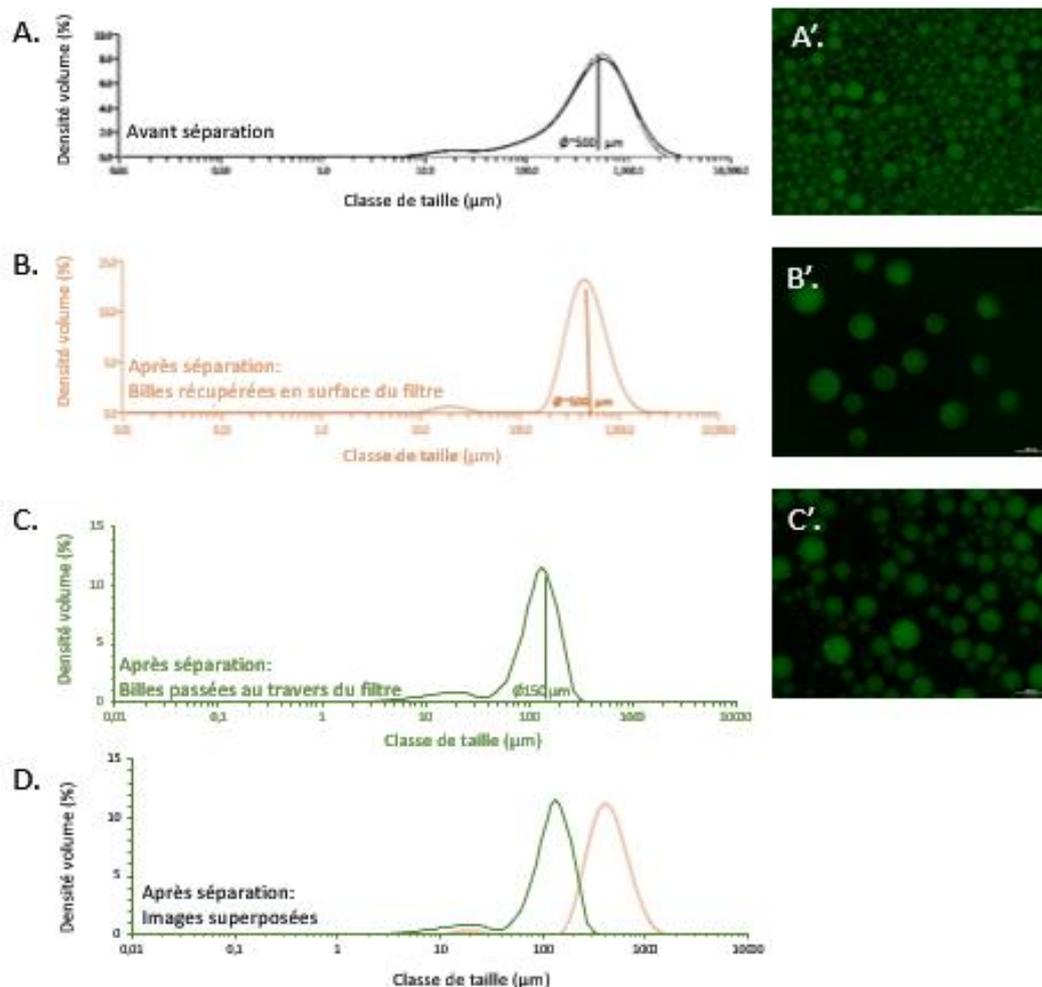


Figure 35. Séparation en transfuseur. (A) Distribution de la taille des microsphères avant séparation. (A') Aspect morphologique des microsphères avant séparation au microscope à fluorescence. (B) Distribution de la taille des microsphères non filtrées. (B') Aspect morphologique des microsphères non filtrées au microscope à fluorescence. (C) Distribution de la taille des microsphères filtrées. (C') Aspect morphologique des microsphères filtrées au microscope à fluorescence. (D) Superposition des courbes B et C.

3. Caractérisation des microsphères de pullulane

Les PMBs produites par une méthode d'émulsion à 23°C et réticulation à 37°C sous agitation à 450 rpm et en présence de 37,5 % (w/w) de STMP puis séparées par filtration en transfuseur sont alors caractérisées. Le rendement, le taux de réticulation, le taux d'hydratation, le taux de gonflement et la résistance à la compression sont ainsi évalués.

3.1. Rendement

Comme décrit précédemment (Cf. Partie expérimentale II.2.4.3.) le rendement est calculé à partir des microsphères préparées, caractérisées et lyophilisées (Figure 36).

Le rendement est réalisé sur un échantillon préparé avant et après filtration sur transfuseur sur les deux parties de l'échantillon (microsphères filtrées et microsphères retenues dans le filtre).



Figure 36. Vue macroscopique de microsphères lyophilisées.

Les calculs effectués (Tableau 3) donnent un rendement final situé aux alentours de 90 % avant ou après filtration des microsphères. Il n'y a donc pas de perte liée à la filtration puisque le total : microsphères filtrées + refus, est comparable à la valeur obtenue avant filtration. Concernant le rendement des microsphères d'intérêt qui est d'environ 50 % soit à peu près 300 mg, cela convient à nos besoins, nécessitant environ 25 mg par injection intra-discale.

Tableau 3. Rendement obtenu avant ou après filtration des microsphères de pullulane.

Rendement avant filtration	Rendement après filtration	
	Microsphères filtrées	Microsphères éliminées
≈90 %	≈ 50 %	≈ 40 %
	≈ 90 %	

3.2. Taux de réticulation

Comme expliqué au préalable (Cf. Revue bibliographique III.3.2.), la réticulation est due à la formation de ponts phosphate entre les chaînes de polysaccharides sous l'influence d'un agent réticulant (le STMP) en milieu basique. Ainsi, afin de connaître le taux de

réticulation, un dosage colorimétrique du phosphore a été réalisé.

Pour une question de maniabilité, certaines caractérisations ne peuvent être réalisées sur les microsphères (ex : taux d'hydratation, taux de gonflement) et la réalisation de matrices a été nécessaire. De ce fait, pour vérifier si l'incorporation du phosphore est similaire dans les matrices à celle obtenue lors de la réticulation des microsphères en émulsion, un dosage dans les deux conditions a été réalisé.

Ce dosage a également permis de déterminer si la concentration initiale en agent réticulant a un impact sur l'efficacité d'incorporation du phosphore. Des concentrations croissantes en STMP ont donc été testées (Figure 37).

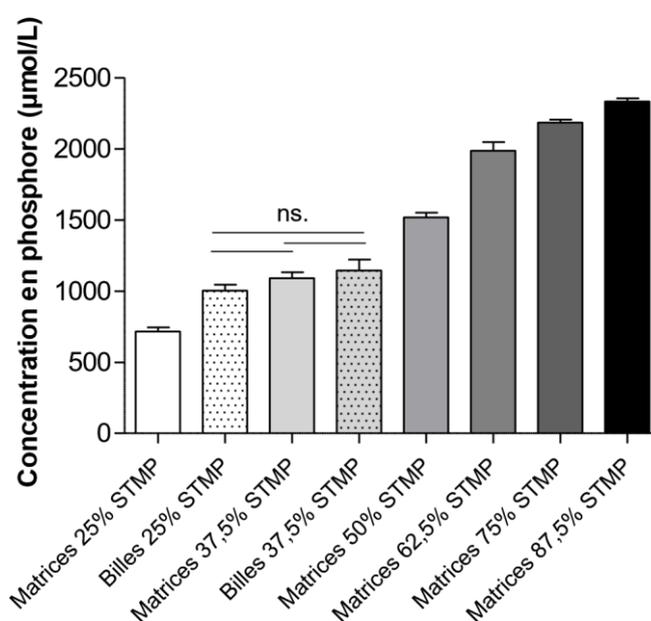


Figure 37. Concentrations en phosphore selon la quantité initiale de STMP intégrée initialement et la mise en œuvre du gel réticulé (microsphères vs matrices). Valeurs moyennes +/- SEM (n=3). ns : non significatif.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de la concentration en phosphore en fonction de la quantité initiale de STMP intégré (Figure 37). L'incorporation du phosphore semble plus efficace lors de la formulation de microsphères en comparaison avec des matrices. En effet, à quantité initiale égale, la concentration finale est plus élevée dans les microsphères. D'après l'analyse statistique ANOVA à un facteur (Analyse des variances), aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les échantillons :

- ✓ microsphères à 25 % de STMP et matrices à 37,5 % de STMP
- ✓ microsphères à 37,5 % de STMP et matrices à 37,5 % de STMP
- ✓ microsphères à 25 % de STMP et à microsphères 37,5 % de STMP

L'incorporation du phosphore au sein des microsphères à 25 % de STMP comparées aux matrices à 25 % de STMP étant significativement différente contrairement à celle des microsphères à 37,5 % de STMP comparées aux matrices à 37,5 % de STMP. Dans ce contexte, le protocole initial qui contenait 25 % de STMP est remplacé par un nouveau protocole contenant 37,5 % de STMP. Ainsi, l'incorporation du phosphore étant équivalente les résultats seront extrapolables quelle que soit la mise en forme choisie pour les analyses.

D'après les calculs effectués (Tableau 4 A) l'efficacité d'incorporation dans une matrice augmente jusqu'à atteindre son maximum pour un taux initial de 62,5 % de STMP soit $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$. Il apparaît qu'avec une quantité initiale importante d'agent réticulant, un seuil d'incorporation est atteint. Les résultats obtenus indiquent une diminution du taux d'incorporation au-delà de 62,5 % de STMP initial. Cette baisse ne peut être prise en compte en raison de la difficulté à mélanger les produits lors de la préparation des matrices avec de telles quantités initiales. Cette analyse semble donc corrélérer avec les données de la littérature (182) qui indiquent une concentration critique d'incorporation du STMP de $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$.

Dans une microsphère (Tableau 4 B), l'efficacité d'incorporation du phosphore a déjà atteint son maximum à 25 % de STMP initial.

Tableau 4. Efficacité d'incorporation du phosphore (A) dans les matrices ou (B) dans les microsphères.

A. % STMP dans les matrices	25	37,5	50	62,5	75	87,5
C° moyenne en P mesurée (μM)	716	1092	1517	1987	2184	2332
Qtté moyenne de P mesurée (μmoles)	3,58	5,46	7,58	9,93	10,92	11,66
Qtté moyenne de P initiale calculée (μmoles)	245	368	490	613	735	858
Efficacité d'incorporation (%)	1,46	1,48	1,55	1,62	1,48	1,36

B. % STMP dans les microsphères	25	37,5
C° moyenne en P mesurée (μM)	1002	1144
Qtté moyenne de P mesurée (μmoles)	5,01	5,72
Qtté moyenne de P initiale calculée (μmoles)	242	368
Efficacité d'incorporation (%)	2,05	1,56

3.3. Taux d'hydratation

Celui-ci rend compte de la quantité totale d'eau libre et liée de l'hydrogel réticulé. Ce taux est mesuré sur des matrices de pullulane préparées avec 37,5 % de STMP en raison de la difficulté à manipuler des microsphères de 100 μm . Les matrices préparées sont pesées avant (Figure 38) et après (Figure 39) séchage à l'étuve.



Figure 38. Matrices de pullulane hydratées



Figure 39. Matrices de pullulane après déshydratation à l'étuve

On obtient un taux d'hydratation d'environ 90 % ce qui correspond à celui d'un hydrogel et celui de la MEC.

3.4. Taux de gonflement

Pour les mêmes raisons que précédemment, le taux de gonflement a été déterminé d'après une analyse faite sur des matrices et non des microsphères.

L'étude du gonflement est un test d'évaluation de la composition chimique d'un polymère réticulé. Il permet d'évaluer la capacité du polymère à retenir l'eau.

Pour le déterminer, le réseau de polymère est lyophilisé (Figure 40 A) et mis en contact avec un excès de solvant (PBS 1X) (Figure 40 B). Le taux de gonflement en masse est défini par pesée lorsque le système a atteint l'équilibre.



Figure 40. Etude du gonflement : (A) Vues macroscopiques de matrices de pullulane/pullulane-FITC lyophilisées. (B) Matrice de pullulane en cours de gonflement dans du PBS 1X.

Le taux de gonflement calculé est d'environ 600 %. Pour comparaison, des matrices de pullulane/dextrane (3:1) ont un taux de gonflement supérieur à 6000 % (175).

3.5. Test de résistance à la compression

Le test de résistance à la compression permet d'avoir une donnée sur l'élasticité du système.

Ce test, a été réalisé en triplicat sur des microsphères de pullulane/pullulane-FITC (Figure 41).

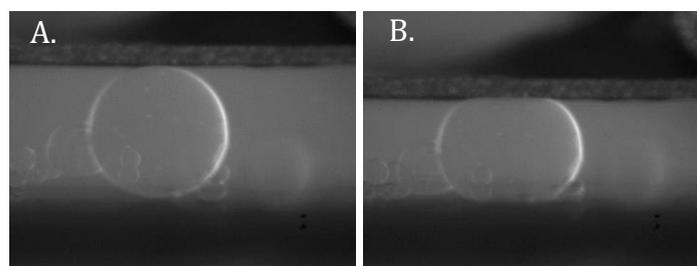


Figure 41. Test de résistance à la compression sur des microsphères de pullulane/pullulane-FITC. (A) Microsphères de pullulane avant compression. (B) Microsphères de pullulane pendant la compression d'une force d'environ 400 μN .

Grâce aux données fournies par le prestataire de service, le module de Young a pu être calculé et donne une information préliminaire sur les propriétés mécaniques des microsphères (Figure 42 et Figure 43).

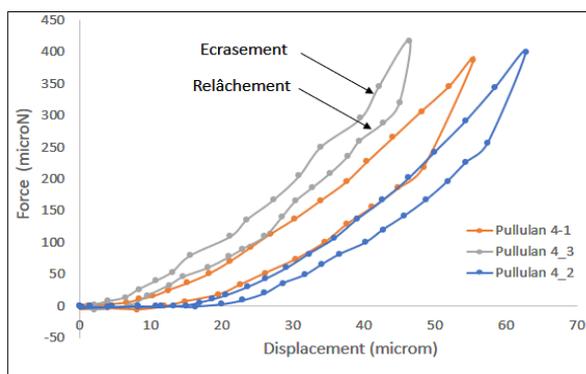


Figure 42. Courbe « Ecrasement/Relâchement » sur trois microsphères de pullulane/pullulane-FITC en fonction de la force de compression appliquée.

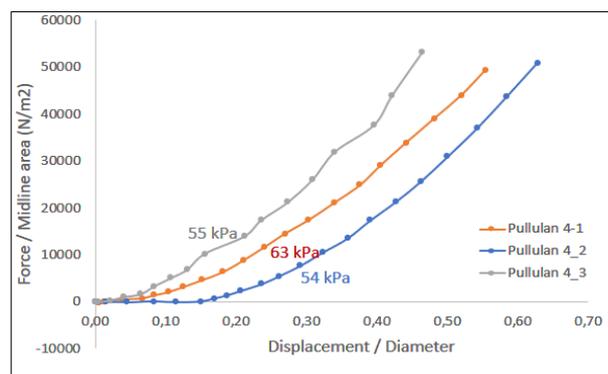


Figure 43. Courbe « Force/Compression de trois microsphères de pullulane/pullulane-FITC et module de Young.

Les premières courbes présentées (Figure 42) rendent compte de la capacité des microsphères de pullulane à résister à l'écrasement tout en reprenant leur forme d'origine

dès lors que la contrainte n'est plus appliquée. Cette reprise de forme initiale sans modification de la forme permet d'établir que les PMBs ont une résistance élastique à la déformation.

La seconde courbe (Figure 43) rend compte du module de Young calculé, attribué à chacune des trois PMBs testées. Celui-ci est d'environ 57 ± 6 kPa. Pour comparaison, le module de Young de microsphères de Si-HPMC est d'environ 0,20 kPa, quant à celui de microsphères d'alginate, il est d'environ 17 kPa. L'objectif étant d'injecter les PMBs au cœur du DIV, celles-ci doivent pouvoir résister à la pression intra-discale. Actuellement la pression au sein du noyau pulpeux du DIV dégénéré n'est pas connue, aucune valeur référence minimale n'est donc établi.

4. Aptitude à répondre à l'application visée

4.1. Taille des microsphères en fonction du solvant de réhydratation

Afin de vérifier que ni la lyophilisation ni le solvant de réhydratation n'ont d'influence sur la taille des PMBs, une étude a été menée en triplicat sur des échantillons préparés selon le protocole définitif. Des analyses granulométriques par diffraction laser et en microscopie à fluorescence sont réalisées. Les conditions suivantes ont été testées :

- ✓ trois échantillons de microsphères conservées dans du NaCl 0,025 %, avant lyophilisation
- ✓ trois échantillons de microsphères lyophilisées et réhydratées dans du NaCl 0,025 %
- ✓ trois échantillons de microsphères lyophilisées et réhydratées dans du PBS 1X.

L'observation effectuée au microscope à fluorescence démontre un aspect sphérique régulier des microsphères (Figure 44 B, C et D).

Les données obtenues après analyse au granulomètre à diffraction laser ont permis d'effectuer une étude statistique sur ces échantillons (Figure 44 A). Ainsi, le diamètre moyen des microsphères avant et après lyophilisation, hydratées dans le même solvant (NaCl 0,025 %) est d'environ 130 μm . D'autre part le diamètre des microsphères est légèrement inférieur lorsqu'elles sont réhydratées dans du PBS 1X en comparaison du NaCl 0,025 % (105 μm et 130 μm respectivement).

Ces résultats révèlent que la lyophilisation n'a pas de conséquence sur la taille des microsphères et permet donc de conserver ce mode de déshydratation. De plus, la taille des microsphères étant plus petite lorsqu'elles sont hydratées dans du PBS 1X, celle-ci correspond à l'objectif fixé (diamètre inférieur à 100 μm). Le PBS 1X pourra donc être utilisé comme solvant d'hydratation des microsphères. A noter que ce PBS 1X est également le solvant permettant la solubilisation du GDF-5, facteur biologique d'intérêt dans l'approche de médecine régénérative défini précédemment.

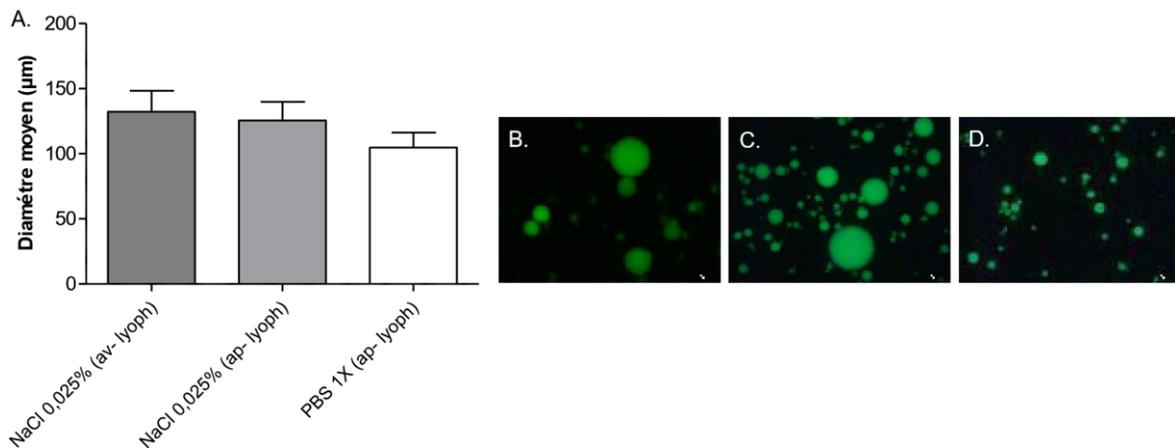


Figure 44. (A) Diamètre moyen des microsphères de pullulane en volume (D [4,3]), avant et après lyophilisation en fonction du solvant d'hydratation. Valeurs moyennes +/- SEM (n=3). Observation au microscope à fluorescence, des microsphères (B) hydratées dans du NaCl 0,025 % avant lyophilisation, (C) réhydratées dans du NaCl 0,025 % après lyophilisation, (D) réhydratées dans du PBS 1X après lyophilisation.

4.2. Comportement des microsphères de pullulane au sein de l'HPMC-Si

Cette expérience a pour objectif de réaliser un essai de dispersion des PMBs dans un hydrogel d'HPMC-Si afin de déterminer leur comportement au sein de cet hydrogel. Il s'agit notamment d'évaluer le maintien de la réticulation du gel, de confirmer l'injectabilité du substitut hydrogel/microsphères et de vérifier l'intégrité des microsphères après mélange dans l'hydrogel.

Après 48h de réticulation, le gel d'HPMC-Si présente un aspect macroscopique comparable à celui observé habituellement. Afin de vérifier le maintien du comportement biomécanique, des analyses rhéologiques seront prochainement menées au sein du laboratoire.

L'injectabilité au travers d'une aiguille 23 G a pu être vérifiée macroscopiquement.

L'observation au microscope à fluorescence (Figure 45) démontre, pré- ou post-injection à l'aide d'une aiguille 23 G, le maintien de l'intégrité des PMBs au sein de l'hydrogel d'HPMC-Si. De plus, une répartition homogène des microsphères est observée.

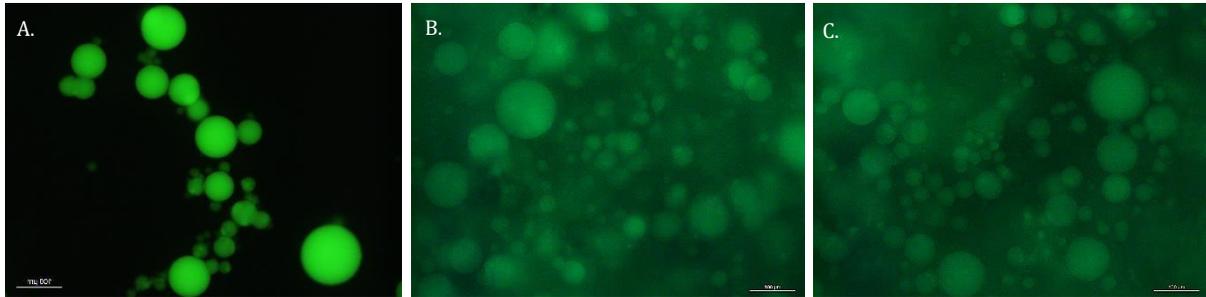


Figure 45. Observation au microscope à fluorescence des microsphères de pullulane/pullulane-FITC. (A) Conservées dans du NaCl 0,025 %. (B) Mélangées à l'HPMC-Si et déposées sans aiguille. (C) Mélangées à l'HPMC-Si et déposées avec aiguille 23G.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La médecine de demain cherche à régénérer les tissus et organes lésés plutôt que de les réparer ou de les remplacer comme cela est encore souvent le cas. Pour permettre de leur restituer intégralement leur fonction, cette médecine régénérative emploie généralement des facteurs biologiques ou des cellules, associés ou non à des biomatériaux. Parmi les trois stratégies qu'elle regroupe, l'ingénierie tissulaire semble particulièrement prometteuse pour le traitement de la dégénérescence discale dont les traitements actuels ne sont là que pour soulager les patients atteints.

L'ambition de ce travail était de mettre au point un système de vectorisation de biomolécules capables de s'intégrer dans une approche thérapeutique d'ingénierie tissulaire innovante au vu du contexte.

L'objectif principal, qui était l'optimisation du protocole de formulation des microsphères de pullulane et leur caractérisation a été mené à bien. Les travaux menés ont permis de préparer des microsphères bien formées morphologiquement, avec un diamètre convenable pour l'injection intra-discale et formulées à partir d'un polymère naturel et d'un agent de réticulation non toxique qui satisfait aux exigences d'une application en médecine régénérative. Ces données ont récemment fait l'objet d'une publication dans le *Journal Drug Delivery* (185).

A la suite de ce projet, des études complémentaires ont été menées par Nina Henry, doctorante à l'U1229 RMeS, afin d'évaluer la capacité de ces microsphères à être chargées en facteurs de croissance GDF-5. Une étude des cinétiques de libération a été déterminée par des dosages ELISA et l'activité du GDF-5 a été évaluée par l'étude de la phosphorylation *in vitro* de la voie des protéines Smad 1/5/8 par western-blot. Les résultats obtenus ont montré une capacité des microsphères à être chargées à près de 100 % en facteurs de croissance (185). De même la cinétique de libération correspond à celle attendue puisque s'étalant de manière continue sur 21 jours et permettant de libérer une quantité de GDF-5, *a priori*, suffisante pour engager la différenciation des CSAh en nucléopulpecytes, grâce au maintien de l'activité du facteur biologique une fois libéré (185).

L'avantage de la formulation mise au point est qu'un certain nombre de paramètres : concentration en agent de réticulation, ajout d'un agent porogène, fonctionnalisation en surface... peuvent être modifiés afin de moduler cette cinétique de libération.

Par ailleurs une étude plus approfondie a été effectuée afin de déterminer les propriétés mécaniques des microsphères telles que : la résistance à la compression, le module d'élasticité ou encore la force du gel d'HPMC-Si une fois incluses dans ce dernier (185). Les microsphères de pullulane ont été analysées sous leur forme native mais aussi chargées en GDF-5, après libération de celui-ci et également suite à leur dégradation (185).

Dans un futur proche, les microsphères chargées en GDF-5 seront associées à l'hydrogel d'HPMC-Si et aux cellules régénératives (CSAh) afin d'évaluer la capacité du substitut formé à régénérer le DIV après son injection *in situ* chez des modèles animaux (souris dans un premier temps et brebis dans un second). Ces expérimentations permettront de valider ou non l'utilisation de ce système dans une stratégie de médecine régénérative du DIV.

D'un point de vue plus personnel, le travail que j'ai mené m'a permis de mettre en application mes connaissances tout en acquérant de nouvelles compétences. J'ai progressivement appris à avoir une démarche de recherche. J'ai eu l'occasion de m'investir pleinement tant au niveau intellectuel que technique. Les divers échanges que j'ai eus avec l'ensemble de l'équipe ont été très enrichissants et m'ont donné l'occasion de me remettre en question, de faire face aux difficultés et d'aller au bout de ce projet qui m'a tout particulièrement intéressée et pour lequel de nombreux travaux restent à réaliser.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Manchikanti L, Singh V, Datta S, et al. Comprehensive review of epidemiology, scope, and impact of spinal pain. *Pain Physician*. 2009;12(4):E35–70.
2. Henry N, Colombier P, Lescaudron L, et al. Médecine régénératrice du disque intervertébral: de la physiopathologie à l'application clinique. *Med Sci*. 2014;30(12):1091–100.
3. Colombier P, Camus A, Lescaudron L, et al. Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers. *Trends Biotechnol*. 2014;32(9):433–5.
4. Whatley BR, Wen X. Intervertebral disc (IVD): structure, degeneration, repair and regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2012;32(2):61–77.
5. Blanquer SBG, Grijpma DW, Poot AA. Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:172–87.
6. Colombier P, Clouet J, Boyer C, et al. TGF- β 1 and GDF5 act synergistically to drive the differentiation of human adipose stromal cells toward nucleus pulposus -like cells. *Stem Cells*. 2016;34:653–67.
7. Bourges X, Weiss P, Daculsi G, et al. Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci*. 2002;99(3):215–28.
8. INSERM. Utilisation d'un hydrogel pour la culture de chondrocytes. Weiss P, Guicheux J, Daculsi P, et al International Patent Office WO 2005044326 A1, 19 mai 2005.
9. Krahn M, Lévy N. Perspectives thérapeutiques pour les maladies génétiques [Internet]. Université Médicale Virtuelle Francophone. 2012 [cited 2017 Nov 16]. Available from: <http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique15/site/html/2.html>
10. Fortier LA. Stem cells: classifications, controverses, and clinical applications. *Vet Surg*. 2005;34(5):415–23.
11. Wyles SP, Brandt EB, Nelson TJ. Stem cells: the pursuit of genomic stability. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):20948–67.
12. Denis JA. Applications médicales et pharmaceutiques des cellules souches pluripotentes: vers un changement paradigmatique? -110p. Th. exercice Pharmacie: Université René Descartes, Paris: 2011, <tel-00637075>.
13. Houssin D. Thérapeutique-Thérapies substitutives et régénératives [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cited 2017 Nov 16]. Available from: <http://www.universalis.fr/encyclopedie/therapeutique-therapies-substitutives->

- et-regeneratives/
14. Ben-Nun IF, Benvenisty N. Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;252(1-2):154-9.
 15. Jensen J, Hyllner J, Björquist P. Human embryonic stem cell technologies and drug discovery. *J Cell Physiol.* 2009;219(3):513-9.
 16. Simonson OE, Domogatskaya A, Volchkov P, et al. The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment. *Ann Med.* 2015;47(5):370-80.
 17. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
 18. Aberdam D. Cellules souches embryonnaires humaines: entre modèle du développement embryonnaire et potentiel en thérapie cellulaire. Espoir, limites et éthique. [Internet]. *Archée: revue d'art en ligne.* [cited 2017 Nov 23]. Available from: <http://archee.qc.ca/ar.php?page=article§ion=texte3¬e=ok&no=309&surli gne=oui&mot=>
 19. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154-6.
 20. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1981;78(12):7634-8.
 21. Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
 22. Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, et al. Establishment of pluripotential cell-lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1983;73:249-261.
 23. Baldwin T. Morality and human embryo research. *EMBO Rep.* 2009;10(4):299-300.
 24. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature.* 2006;444(7118):481-5.
 25. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, et al. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell.* 2008;2(2):113-7.
 26. Rodin S, Antonsson L, Niaudet C, et al. Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. *Nat Commun.* 2014;5(3195):1-13.
 27. LOI n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique [Internet]. [cited 2017 Oct 10]. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2004/8/6/SANX0100053L/jo/texte>
 28. LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique [Internet]. [cited 2017 Oct

- 10]. Available from:
<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2011/7/7/ETSX1117652L/jo/texte>
29. LOI n° 2013-715 du 6 août 2013 tendant à modifier la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires. [Internet]. [cited 2017 Oct 10]. Available from:
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027811435>
30. Dvash T, Ben-Yosef D, Eiges R. Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis. *Pediatr Res*. 2006;60(2):111-7.
31. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*. 2010;120(1):41-50.
32. Eiges R, Schuldiner M, Drukker M, et al. Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr Biol*. 2001;11(7):514-8.
33. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, et al. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(4):2140-5.
34. Zwaka TP, Thomson JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2003;21(3):319-21.
35. Doss MX, Koehler CI, Gissel C, et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):465-73.
36. Règlement (CE) N° 1394/2007 du parlement européen et du conseil du 13 novembre 2007 [Internet]. Journal officiel de l'Union européenne. [cited 2017 Oct 30]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj>
37. Unger C, Skottman H, Blomberg P, et al. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet*. 2008;17(1):48-53.
38. Crook JM, Peura TT, Kravets L, et al. The generation of six clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):490-4.
39. Andrews PW, Cavanagro J, Deans R, et al. Harmonizing standards for producing clinical-grade therapies from pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(8):724-6.
40. Cooke MJ, Stojkovic M, Przyborski SA. Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. *Stem Cells Dev*. 2006;15(2):254-9.
41. Lee AS, Tang C, Rao MS, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med*. 2013;19(8):998-1004.

42. Ocata Therapeutics. Clinical trial NCT02122159: Cells derived from stem cells for myopic macular degeneration [Internet]. [cited 2017 Oct 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02122159?term=Ocata+Therapeutics&cond=AMD&rank=1>
43. Astellas Institute for Regenerative. Clinical trial NCT01345006: Sub-retinal transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) cells in patients with Stargardt's Macular Dystrophy [Internet]. [cited 2017 Oct 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01345006?cond=Stargardt's+macular+dystrophy&draw=1&rank=2>
44. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015;385(9967):509–16.
45. ViaCyte. Clinical trial NCT02239354: A safety, tolerability, and efficacy study of VC-01™ combination product in subjects with Type I Diabetes Mellitus. [Internet]. [cited 2017 Oct 21]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239354?term=ViaCyte&rank=4>
46. ViaCyte. Clinical trial NCT03162926: A safety, tolerability, and efficacy study of VC-02™ combination product in subjects with Type I Diabetes Mellitus [Internet]. [cited 2017 Oct 20]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03162926?term=ViaCyte&rank=2>
47. Hôpitaux de Paris. Clinical trial NCT02057900: Transplantation of human embryonic stem cell-derived CD15+ Isl-1 progenitors in Severe Heart Failure [Internet]. [cited 2017 Oct 21]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02057900?term=hôpital+européen+Georges+Pompidou&cond=cardiac+cell&cntry1=EU%3AFR&rank=1>
48. Balajthy Z, Aradi J, Balajthy Z, et al. Molecular therapies [Internet]. University of Debrecen. 2011 [cited 2017 Nov 23]. p. 1–7. Available from: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_terapia_k_en_book/ch08s02.html
49. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
50. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95(3):379–91.
51. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24(4):372–6.
52. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003;17:126–40.

53. Li Y, Mcclintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Evaluation*. 2005;105(2):635–7.
54. Cartwright P. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005;132(5):885–96.
55. Yu J, Vodyanik M, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917–20.
56. Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003;113(5):643–55.
57. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003;113:631–42.
58. Shyh-Chang N, Daley GQ. Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):395–406.
59. Chin MH, Mason MJ, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1):111–23.
60. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes&Development*. 2010;24:2239–63.
61. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*. 2008;26(11):1276–84.
62. Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*. 2008;26(10):2467–74.
63. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008;321(5881):699–702.
64. Utikal J, Maherali N, Kulalert W, et al. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 2009;122(19):3502–10.
65. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic β cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*. 2008;18(12):890–4.
66. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 2008;133(2):250–64.
67. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(4):268–77.
68. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic changes in the copy number of

- pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*. 2011;8(1):106–18.
69. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618–30.
 70. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011;8(5):409–12.
 71. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Japan Acad Ser B*. 2009;85(8):348–62.
 72. Bahmad H, Hadadeh O, Chamaa F, et al. Modeling human neurological and neurodegenerative diseases: from induced pluripotent stem cells to neuronal differentiation and its applications in neurotrauma. *Front Mol Neurosci*. 2017;10(50):1–17.
 73. Kondo Y, Toyoda T, Inagaki N, et al. iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *J Diabetes Investig*. 2017;1–10.
 74. Hashimoto A, Naito AT, Lee J-K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from patients with Duchenne muscular dystrophy and their induction to cardiomyocytes. *Int Heart J*. 2015;57(1):112–7.
 75. Takahashi K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*. 2013;140(12):2457–61.
 76. Ma H, Morey R, O’Neil RC, et. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature*. 2014;511(7508):177–83.
 77. Cyranoski D. Stem-cell pioneer banks on future therapies. *Nature*. 2012;488(7410):139.
 78. Cyranoski D. Stem cells cruise to clinic. *Nature*. 2013;494(7438):413–413.
 79. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1038–46.
 80. Nishimura K, Doi D, Samata B, et al. Estradiol facilitates functional integration of iPSC-derived dopaminergic neurons into striatal neuronal circuits via activation of integrin $\alpha 5\beta 1$. *Stem Cell Reports*. 2016;6(4):511–24.
 81. Tarnowski M, Sieron AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit*. 2006;12(8):RA154-RA163.
 82. Sohni A, Verfaillie CM. Multipotent Adult Progenitor Cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24:3–11.
 83. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*.

- 2006;311(5769):1880–5.
84. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21(1):605–31.
 85. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 2000;287(5457):1442–7.
 86. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143–7.
 87. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287(5457):1433–8.
 88. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998;353(1370):821–30.
 89. Watt FM. Epidermal stem cells: markers , patterning and the control of stem cell fate
Epidermal stem cells : markers , patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998;353(1370):831–7.
 90. Alison M. Hepatic stem cells. *Transplant Proceeding.* 2002;34(7):2702–5.
 91. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, et al. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998;125(4):725–32.
 92. Slukvin II, Vodyanik M. Endothelial origin of mesenchymal stem cells. *Cell Cycle.* 2011;10(9):1370–3.
 93. Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells.* 2009;27(5):1142–51.
 94. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14(2):213–22.
 95. Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood.* 1974;43(3):357–61.
 96. Peters C, Cornish JM, Parikh SH, et al. Stem cell source and outcome after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children and adolescents with acute leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2010;57(1):27–46.
 97. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res Res.* 1991;9:641–50.
 98. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4(5):267–74.
 99. Afanasyev B V., Elstner EE, Zander AR. A. J. friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cell Ther Transplant.* 2009;1(3):35–8.
 100. Blau H, Brazelton T, Weimann J. The evolving concept of a stem cell-entity or

- function? *Cell*. 2001;105:829–41.
101. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005;309:314–8.
 102. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*. 2004;113(12):1701–10.
 103. Anjos-Afonso F, Bonnet D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1 cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*. 2007;109(3):1298–306.
 104. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284(5417):1168–70.
 105. Herrero C, Pérez-Simón JA. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Brazilian J Med Biol Res*. 2010;43(5):425–30.
 106. García-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6B):2552–65.
 107. Sackstein R. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004;9(3):215–23.
 108. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41–9.
 109. Coulombel L. Cellules souches tissulaires adultes: seing is not being. *Médecine Sci*. 2003;19(6–7):683–94.
 110. Peschanski M, Jorgensen C. Cellules souches et thérapie cellulaire [Internet]. INSERM. 2015 [cited 2017 Nov 16]. Available from: <https://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/cellules-souches-et-therapie-cellulaire>
 111. Colombier P, Clouet J, Hamel O, et al. The lumbar intervertebral disc: From embryonic development to degeneration. *Jt Bone Spine*. 2013;81(2):125–9.
 112. Skalak R, Fox CF. Tissue engineering: Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988 (UCLA symposia on molecular and cellular biology). Alan R. Liss I, editor. New York; 1988. 30 p.
 113. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920–6.
 114. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, et al. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cells Mater*. 2013;26:120–32.
 115. Williams DF. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of

- the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Elsevier Science Ltd, editor. New York; 1987.
116. Yang S, Leong K-F, Du Z, et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* 2001;7(6):679–89.
 117. Merceron C, Vinatier C, Clouet J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and biomaterials for cartilage tissue engineering. *Jt Bone Spine.* 2008;75(6):672–4.
 118. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, et al. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.* Press A, editor. New York; 1997.
 119. Papon P, Leblond J, Meijer PHE. *The physics of phase transitions: concepts and applications.* 2nd ed. Springer, editor. Berlin; 2006.
 120. Almdal K, Dyre J, Hvidt S. Towards a phenomenological definition of term “gel.” *Polym Gels Networks.* 1993;1:5–17.
 121. Kavanagh MG, Ross-Murphy SB. Rheological characterisation of polymer gels. *Prog Polym Sci.* 1998;23:533–62.
 122. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(1):3–12.
 123. Buwalda SJ, Boere KW, Dijkstra PJ, et al. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J Control Release.* 2014;190:254–73.
 124. Wichterle O., Lim D. Hydrophilic gels in biological use. *Nature.* 1960;185(4706):117–8.
 125. Lim F, Sun A. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science.* 1980;210(4472):908–10.
 126. Yannas I V, Lee E, Orgill DP, et al. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(3):933–7.
 127. Schlegel PN, Kuzma P, Frick J, et al. Effective long-term androgen suppression in men with prostate cancer using a hydrogel implant with the GnRH agonist histrelin. *Urology.* 2001;58(4):578–82.
 128. Mosahebi A, Simon M, Wiberg M, et al. A Novel use of alginate hydrogel as schwann cell matrix. *Tissue Eng.* 2004;7(5):525–34.
 129. Kang A, Park J, Ju J, et al. Cell encapsulation via microtechnologies. *Biomaterials.* 2014;35(9):2651–63.
 130. Perez RA, Kim H. Core-shell designed scaffolds for drug delivery and tissue engineering. *Acta Biomater.* 2015;21:2–19.
 131. Ramteke KH, Jadhav VB, Dhole SN. Microspheres: as carrieres used for novel drug

- delivery system. *IOSR J Pharm.* 2012;2(4):44–8.
132. Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. *Microencapsulation: des sciences aux technologies.* TEC & DOC. Lavoisier, editor. Paris; 2007.
133. Richard J, Benoît J-P, Venier-Julienne MC. *Microencapsulation* [Internet]. *Techniques de l'Ingénieur.* 2013 [cited 2017 Nov 16]. Available from: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/cosmetiques-42634210/microencapsulation-j2210/>
134. MR, EAM, RV. *TPE Textiles intelligents* [Internet]. [cited 2017 Nov 23]. Available from: <http://tpe-textiles-intelligents.e-monsite.com/pages/ii-principes-a-la-base-des-textiles-intelligents/c.html>
135. Nafti Y. *Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif: oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation* [Internet]. *Mémoire Online.* 2008 [cited 2017 Nov 23]. Available from: https://www.memoireonline.com/04/11/4448/m_Contribution--letude-de-la-cinetique-de-liberation-dun-principe-actif-oxacilline-sodique-e6.html
136. Prasad BSG, Gupta VRM, Devanna N, et al. *Microspheres as drug delivery system-a review.* *JGTPS.* 2014;5(3):1961–72.
137. Prasanth VV, Moy AC, Mathew ST, et al. *Microspheres: an overview.* *Int J Pharm Biomed Sci.* 2011;2(2):332–8.
138. Gouin S. *Micro-encapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends.* *Trends in Food&Technology.* 2004;15:330–47.
139. Das SK, David SRN, Rajabalaya R, et al. *Microencapsulation techniques and its practices.* *Int J Pharm Sci Technol.* 2011;6(2):1–23.
140. Arshady R. *Microspheres, microcapsules and liposomes, Vol 1: preparations and chemical applications.* Citus Books, editor. London; 1999.
141. Patel NR, Patel DA, Bharadia PD, et al. *Microsphere as a novel drug delivery.* *Int J Pharm Life Sci Sci.* 2011;2(8):992–7.
142. Arshady R. *Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: a methodological survey.* *Colloid&Polymer Sci.* 1992;270(8):717–32.
143. Sandler SR, Karo W. *Polymer syntheses, Vol 2, 2nd édition.* Elsevier, editor. 2012.
144. Dupasquier ML, Nazari A, Fontaine-Vive F, et al. *Formulation cosmétique: les émulsions* [Internet]. [cited 2017 Nov 16]. Available from: http://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/formulations_1.html
145. O'Donnell PB, McGinity JW. *Preparation of caprolactone microcapsules by the solvent evaporation technique.* *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28:25–42.
146. Pandya P, Gattani S, Jain P, et al. *Co-solvent evaporation method for enhancement*

- of solubility and dissolution rate of poorly aqueous soluble drug Simvastatin: in vitro-in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(4):1247–52.
147. Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release*. 2005;102:313–32.
 148. PharmaTutor. Microencapsulation drug delivery system – an overview [Internet]. [cited 2017 Nov 20]. Available from: <http://www.pharmatutor.org/articles/microencapsulation-drug-delivery-system-an-overview?page=1>
 149. Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv Colloid Interface Sci*. 2015;223:40–54.
 150. Choi KS, Cohn MJ, Harfe BD. Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: implications for disk degeneration and chordoma formation. *Dev Dyn*. 2008;237(12):3953–8.
 151. McCann MR, Tamplin OJ, Rossant J, et al. Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech*. 2012;5(1):73–82.
 152. Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis. *Exp Cell Res*. 1999;246(1):129–37.
 153. Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering. *Jt Bone Spine*. 2009;76(6):614–8.
 154. Clouet J. Développement de l'ingénierie tissulaire du disque intervertébral: de la physiopathologie aux modèles animaux. -227p. Th. de doctorat: Université de Nantes: 2010.
 155. Henry N, Clouet J, Le Bideau J, et al. Innovative strategies for intervertebral disc regenerative medicine: from cell therapies to multiscale delivery systems. *Biotechnol Adv* (Accepted 2017 Nov).
 156. The Foundation for Spinal Research, Education and Humanitarian Care I. Clinical trial NCT02529566: Human autograft mesenchymal stem cell mediated stabilization of the degenerative lumbar spine [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02529566>
 157. Bioheart Inc. Clinical trial NCT02097862: Adipose cells for degenerative disc disease [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02097862>
 158. Red de Terapia Celular. Clinical trial NCT01513694: Clinical trial based on the use of mesenchymal stem cells from autologous bone marrow in patients with lumbar intervertebral degenerative disc disease [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01513694>

159. Inbo Han. Clinical trial NCT02338271: Autologous adipose derived stem cell therapy for intervertebral disc degeneration [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02338271>
160. Red de Terapia Celular. Clinical trial NCT01860417: Treatment of degenerative disc disease with allogenic mesenchymal stem cells (MSV) (Disc _ allo) [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01860417>
161. Mesoblast Ltd. Clinical trial NCT01290367 : Safety and preliminary efficacy study of mesenchymal precursor cells (MPCs) in subjects with lumbar back pain [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01290367>
162. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials*. 2006;27(3):335–45.
163. Ruan D-K, Xin H, Zhang C, et al. Experimental intervertebral disc regeneration with tissue-engineered composite in canine model. *Tissue Eng Part A* April. 2010;16(7):2381–9.
164. Huang B, Zhuang Y, Chang-Qing, et al. Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(26):2252–9.
165. DePuy Spine. Clinical trial NCT01124006: A multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled, clinical trial to evaluate the safety, tolerability and preliminary effectiveness of 2 doses of intradiscal rhGDF-5 (single administration) for the treatment of early [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01124006>
166. DePuy Spine. Clinical trial NCT00813813 : intradiscal rhGDF-5 phase I / II clinical trial [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00813813>
167. DePuy Spine. Clinical trial NCT01182337 : A clinical trial to evaluate the safety , tolerability and preliminary effectiveness of single administration intradiscal rhGDF-5 for the treatment of early stage lumbar disc degeneration [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01182337>
168. DePuy Spine. Clinical trial NCT01158924 : A clinical trial to evaluate the safety , tolerability and preliminary effectiveness of single administration intradiscal rhGDF-5 for the treatment of early stage lumbar disc degeneration [Internet]. [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01158924>
169. Bonnard T, Yang G, Petiet A, et al. Abdominal aortic aneurysms targeted by functionalized polysaccharide microparticles: a new tool for SPECT imaging. *Theranostics*. 2014;4(6):592–603.

170. Schlaubitz S, Derkaoui SM, Marosa L, et al. Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats. *PLoS One*. 2014;9(10):e110251.
171. Cheng K-C, Demirci A, Catchmark JM. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;92(1):29–44.
172. Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(4):771–80.
173. Shingel KI. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydr Res*. 2004;339(3):447–60.
174. Mishra B, Vuppu S, Rath K. The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: a review. *J Appl Pharm Sci*. 2011;1(6):45–50.
175. Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, et al. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater*. 2010;6(9):3640–8.
176. Sugumaran KR, Ponnusami V. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. *Carbohydr Polym*. 2017;173:573–91.
177. Singh RS, Kaur N, Rana V, et al. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. *Carbohydr Polym*. 2017;171:102–21.
178. Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O, et al. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv Transl Res*. 2015;5(2):187–97.
179. Baimark Y, Srisuwan Y. Preparation of polysaccharide-based microspheres by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for drug carriers. *Int J Polym Sci*. 2013;2013:1–7.
180. Kuijpers AJ, Engbers GH, Krijgsveld J, et al. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym*. 2000;11(3):225–43.
181. Lack S, Dulong V, Picton L, et al. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydr Res*. 2007;342(7):943–53.
182. Lack S, Dulong V, Le Cerf D, et al. Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study. *Polym Bull*. 2004;52(6):429–36.
183. Merceron C, Portron S, Masson M, et al. Cartilage tissue engineering: from hydrogel to mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng*. 2010;20(3–4):159–66.
184. Mathieu E, Lamirault G, Toquet C, et al. Intramyocardial delivery of mesenchymal

- stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS One*. 2012;7(12):e51991.
185. Henry N, Clouet J, Fragale A, et al. Pullulan microbeads/Si-HPMC hydrogel injectable system for the sustained delivery of GDF-5 and TGF- β 1: new insight into intervertebral disc regenerative medicine. *Drug Deliv*. 2017;24(1):999–1010.



SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.



Ordre national
des pharmaciens

ABSTRACT : Intervertebral disc (IVD) degeneration is one of the major causes of low back pain. The current treatments are essentially consisting in the management of symptoms. Regenerative medicine approach, based on supplements of stem cells (cellular therapy) in association or not with biomaterials (tissue engineering) is the future perspective for these treatments. To induce the differentiation of human adipose stromal cells into disc cells, the pivotal role of Growth Differentiation Factor-5 (GDF-5) has recently been demonstrated. The aim of this work was to develop and to characterize pullulan microbeads (PMBs) able to be further loaded with GDF-5 in order to provide sustained and controlled release, to protect it and to prevent its leakage after injection. PMBs were prepared with an emulsion/crosslinking method from pullulan solution mixed with a crosslinker agent (sodium trimetaphosphate, STMP) in basic condition, and emulsified in rapeseed oil. Non-porous particles, morphologically well formed and of a size allowing their intra-discal injection were obtained. The characterization included size and morphology, yield, crosslinking content, swelling ratio and hydration level. Mechanical properties were investigated by compression.

Future work will need to determine the ability of these microspheres to be loaded with growth factor and to induce the differentiation of ASCs to confirm of particular interest of this approach for regenerative IVD medicine.

TITLE : Formulation and characterization of a biomaterial for intervertebral disc regeneration

DISCIPLINE : Pharmacy

KEYWORDS : Intervertebral disc; Regenerative medicine; Biomaterial; Microparticles; Formulation; Pullulan

TITLE AND ADDRESS OF LABORATORY:

Laboratoire de Pharmacie galénique et biopharmacie
Faculté de Pharmacie, Université de Bordeaux
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

RÉSUMÉ : La dégénérescence discale est l'une des causes majeures de lombalgies. Les traitements actuels, essentiellement à visée symptomatique, devraient laisser place à des approches de médecine régénérative basées sur l'utilisation de cellules souches (thérapie cellulaire) associées ou non à des biomatériaux (ingénierie tissulaire). Afin d'induire la différenciation de cellules souches adipeuses humaines, en cellules discales, nous avons récemment démontré le rôle central du facteur de croissance GDF-5. Le but de ce travail était de développer et caractériser des microsphères de pullulane (PMBs) capables d'être chargées par la suite en GDF-5, d'en assurer une libération prolongée et contrôlée en évitant sa fuite après injection. Les PMBs ont été préparées par une méthode d'émulsion/réticulation à partir d'une solution de pullulane émulsionnée dans de l'huile de colza en présence d'un agent réticulant (Trimétaphosphate de sodium, STMP), en condition basique. La taille et la morphologie des PMBs ont été respectivement caractérisées par granulométrie à diffraction laser et microscopie à fluorescence. Le rendement, le taux de réticulation, de gonflement et d'hydratation ont été calculés. Les propriétés mécaniques ont été évaluées par l'étude de la résistance à la compression. Des particules non poreuses, morphologiquement bien formées et d'une taille permettant leur injection en intra-discale ont été obtenues. Les travaux futurs devront déterminer l'aptitude de ces microsphères à être chargées en GDF-5 et à induire la différenciation des cellules souches afin de confirmer l'intérêt de cette approche pour la médecine régénérative du disque intervertébral.

DISCIPLINE : Pharmacie

MOTS-CLÉS : Disque intervertébral ; Médecine régénérative ; Biomatériau ; Microparticules ; Formulation ; Pullulane

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Pharmacie galénique et biopharmacie
Faculté de Pharmacie, Université de Bordeaux
146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex