



UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

UFR DE PHARMACIE

Année : 2024

N°

THÈSE D'EXERCICE

Pour l'obtention du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

le 29 Avril 2024 à 15h30

par

Florian SEGERON

**PLACE DE L'ACIDE HYALURONIQUE EN SANTE, UN PRODUIT BIOTECHNOLOGIQUE :
DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX MEDICAMENTS, APPLICATIONS MEDICALES ET
ETUDE DE SA DEGRADATION**

Directeur de thèse : **Pr. Éric BEYSSAC**

Jury

Président :	Pr. Éric BEYSSAC	Pharmacien, Professeur, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
Membres :	Dr. Adrien ROSSARY	Pharmacien, Maître de conférences, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
	Dr. Éric DEBITON	Maître de conférences, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
	Dr. Hubert GORNY	Pharmacien chercheur, CNRS Paris

REMERCIEMENTS

Au Professeur Éric BEYSSAC, Pharmacien, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail et de présider ce jury.

Pour votre disponibilité et pour la confiance que vous m'avez accordé dans ce travail.

Pour vos nombreux enseignements lors mes années d'études.

Au Docteur Adrien ROSSARY, Pharmacien, Maître de conférences, qui me fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Pour vos enseignements de biochimie et de biologie moléculaire lors de mes années d'études.

Au Docteur Éric DEBITON, Maître de conférences, qui me fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Pour vos enseignements des biotechnologies lors de mes années d'études.

Au Docteur Hubert GORNY, Pharmacien chercheur, qui me fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Pour son soutien dans la réalisation de ce travail et mes années d'études passées à ses côtés.

Au Docteur Alexis GAUDIN, Chirurgien-dentiste, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier à l'université de Nantes.

Pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur son projet de recherche au sein de l'INSERM en intégrant l'unité RMES, dont je remercie également tous les membres pour leur soutien dans mes travaux sur ce projet.

Pour ses enseignements, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordé dans son projet.

Au service R&D des laboratoires Vivacy pour l'expérience enrichissante que j'ai pu acquérir au sein de leur équipe.

A mes proches et ma famille pour leur soutien pendant mes années d'études.

A tous mes amis de la faculté de Pharmacie de Nantes et de Clermont-Ferrand pour ces merveilleuses années passées à leurs côtés.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à mes années d'études et à toutes celles que j'aurai pu oublier.

SOMMAIRE

LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX.....	15
LISTE DES ANNEXES	16
PUBLICATION	17
INTRODUCTION GENERALE.....	18
CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE, GENERALITES ET PREREQUIS.....	20
1 PRESENCE DE L'ACIDE HYALURONIQUE DANS LE MONDE VIVANT	20
1.1 L'ACIDE HYALURONIQUE CHEZ L'HOMME ET LES VERTEBRES	20
1.1.1 Répartition globale et concentrations dans les différents tissus.....	20
1.1.2 Exemple de son implication dans l'articulation synoviale	21
1.2 L'ACIDE HYALURONIQUE DANS LE REGNE BACTERIEN.....	22
1.3 L'ACIDE HYALURONIQUE DANS LE REGNE VEGETAL ET FONGIQUE	23
1.3.1 Production de l'acide hyaluronique chez les végétaux.....	23
1.3.2 Production de l'acide hyaluronique chez les champignons.....	24
1.4 CAS PARTICULIER DE L'ACIDE HYALURONIQUE CHEZ LES VIRUS	25
2 CARACTERISTIQUES DE L'ACIDE HYALURONIQUE.....	27
2.1 STRUCTURE.....	27
2.1.1 Structure chimique.....	27
2.1.2 Structure à l'état solide.....	28
2.2 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	29
2.2.1 Masse moléculaire et masse molaire.....	29
2.2.2 Solubilité et rhéologie	30
2.2.3 Sensibilité à la dégradation par différents agents	33
3 BIOSYNTHESE ET FONCTIONS BIOLOGIQUES.....	38
3.1 BIOSYNTHESE	38
3.1.1 Les Hyaluronic Acid Synthases : Structure et mécanisme	38
3.1.2 Rôle des différentes HAS	40
3.2 FONCTIONS BIOLOGIQUES	42
3.2.1 Les principaux récepteurs de l'acide hyaluronique : CD44 et RHAMM	42

3.2.2	<i>Rôle structural de l'acide hyaluronique dans la MEC</i>	45
3.2.3	<i>L'acide hyaluronique dans la peau</i>	46
3.2.4	<i>L'acide hyaluronique dans l'os et le cartilage</i>	48
3.2.5	<i>L'acide hyaluronique dans l'angiogenèse physiologique et pathologique</i>	49
3.2.6	<i>Rôles dans la cicatrisation</i>	51
3.2.7	<i>Implication dans la Réponse Immunitaire</i>	53
3.2.8	<i>L'acide hyaluronique dans le processus de cancérisation</i>	55
3.2.9	<i>Pathologies pulmonaires</i>	57

CHAPITRE II : PRODUCTION DE L'ACIDE HYALURONIQUE, APPLICATIONS EN SANTE ET REGLEMENTATIONS

.....		58
1	VOIES D'OBTENTION, MODIFICATIONS CHIMIQUES ET CONTROLES QUALITE	58
1.1	EXTRACTION ANIMALE	58
1.2	PRODUCTION BIOTECHNOLOGIQUE	59
1.2.1	<i>Exemples de procédés de synthèse avec le genre Streptococcus</i>	59
1.2.2	<i>Synthèse par fermentation bactérienne dans des hôtes recombinants</i>	61
1.2.3	<i>Synthèse chimio-enzymatique</i>	62
1.2.4	<i>Purification</i>	63
1.3	MODIFICATIONS CHIMIQUES ET RETICULATION	64
1.4	CONTROLE QUALITE ET STANDARDS D'ANALYSE EN INDUSTRIE	66
1.4.1	<i>Analyse qualitative</i>	66
1.4.2	<i>Analyse quantitative</i>	67
1.4.3	<i>Viscosité</i>	67
1.4.4	<i>Elasticité</i>	71
1.4.5	<i>Pureté et biocompatibilité</i>	74
2	APPLICATIONS ET REGLEMENTATIONS	76
2.1	DEFINITIONS	76
2.1.1	<i>Définition du dispositif médical</i>	76
2.1.2	<i>Définition du médicament</i>	77
2.1.3	<i>Définition des produits cosmétiques</i>	77
2.2	EXEMPLES D'APPLICATIONS EN SANTE	77
2.2.1	<i>L'acide hyaluronique en tant que dispositif médical</i>	78
2.2.2	<i>L'acide hyaluronique dans les médicaments</i>	81
2.2.3	<i>Acide hyaluronique et cosmétiques</i>	83
2.3	REGLEMENTATIONS APPLIQUEES EN FRANCE ET EN EUROPE.....	85
2.3.1	<i>Réglementations et exigences générales</i>	85

2.3.2	<i>Réglementations spécifiques aux dispositifs médicaux</i>	86
2.3.3	<i>Réglementations spécifiques aux médicaments</i>	87
2.3.4	<i>Réglementations spécifiques aux produits cosmétiques</i>	87

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE – FORMULATION D’UN SYSTEME DE DELIVRANCE DE MEDICAMENT
..... **89**

1 INTRODUCTION..... **90**

2 MATERIELS ET METHODES **94**

2.1 FORMULATION ET CARACTERISATION DES EMULSIONS..... 94

2.1.1 *Fabrication avec un mélangeur à pales*

2.1.2 *Fabrication avec seringues connectées*.....

2.1.3 *Encapsulation du Nile Red dans les globules lipidiques*

2.1.4 *Tests de stabilité par centrifugation*.....

2.1.5 *Observations microscopiques et macroscopiques*

2.1.6 *Mesure de la taille des globules lipidiques*.....

2.1.7 *Étude d’une alternative au Tween 20 : Poloxamère 188*.....

2.2 FABRICATION ET CARACTERISATION DES HYDROGELS H-MPE ET H-SE..... 102

2.2.1 *Synthèse des hydrogels HA-Si*.....

2.2.2 *Mesures rhéologiques*.....

2.2.3 *Mesure de l’injectabilité*.....

2.2.4 *Observations en microscopie optique et macroscopie à fluorescence*.....

2.2.5 *Observation en CryoMEB*.....

3 RESULTATS **104**

3.1 ÉMULSIONS 104

3.1.1 *Formulation des séries d’émulsions*

3.1.2 *Étude de l’impact du tensioactif et de la température de fabrication*.....

3.1.3 *Observation au microscope numérique des émulsions SE et MPE*.....

3.1.4 *Encapsulation du Nile Red dans les émulsions SE et MPE*.....

3.1.5 *Mesure de la taille des globules des émulsions SE et MPE*

3.1.6 *Formulation de l’émulsion SE6-HPMC5 avec le Poloxamère 188*.....

3.2 FABRICATION ET CARACTERISATION DES HYDROGELS H-MPE ET H-SE..... 110

3.2.1 *Observations macroscopiques et microscopique*.....

3.2.2 *Observation en CryoMEB*.....

3.2.3 *Mesures rhéologiques*.....

3.2.4 *Mesures d’injectabilité sur gels réticulés*

4	DISCUSSION	113
4.1	ÉMULSIONS	113
4.1.1	<i>Formulation des séries d'émulsion</i>	113
4.1.2	<i>Étude de l'impact du tensioactif et de la température de fabrication</i>	114
4.1.3	<i>Encapsulation du Nile Red dans les émulsion SE et MPE</i>	115
4.1.4	<i>Mesure de la taille des globules des émulsions SE et MPE</i>	115
4.1.5	<i>Étude d'une alternative au tween 20 : Poloxamère 188</i>	116
4.2	HYDROGELS	116
4.2.1	<i>Observations en microscopie optique et macroscopie à fluorescence</i>	116
4.2.2	<i>Observation en CryoMEB</i>	117
4.2.3	<i>Mesures rhéologiques</i>	117
4.2.4	<i>Mesure d'injectabilité sur gels réticulés</i>	118
5	CONCLUSION	119
6	POURSUITE DU PROJET PAR L'EQUIPE RMES	120
6.1	EMULSIONS ME ET SE	120
6.2	HYDROGELS H-MELX ET H-SELX	121
6.3	CONCLUSION	122
	CHAPITRE IV : FOCUS SUR LES MECANISMES DE DEGRADATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE	123
1	DEGRADATION ENZYMATIQUE	123
1.1	LA HYALURONIDASE	123
1.2	MECANISME DE DEGRADATION DES HYALURONIDASES HUMAINES	127
1.3	APPLICATION DE LA HYALURONIDASE EN SANTE ET ETUDE IN VITRO	128
2	DEGRADATION RADICALAIRE ET OXYDATIVE	130
2.1	GENERATION DES RADICAUX LIBRES	130
2.2	MECANISMES DE DEGRADATION	131
2.3	ÉTUDE IN VITRO	134
	CONCLUSION GENERALE	136
	BIBLIOGRAPHIE	138

LISTE DES ACRONYMES ET DES ABREVIATIONS

A	ADN	Acide désoxyribonucléique
	AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
	AH	Acide hyaluronique
	AMM	Autorisation de mise sur le marché
	ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
<hr/>		
B	BDDE	1,4-Butanediol diglycidyl ether
	BPF	Bonnes pratiques de fabrication
<hr/>		
C	CD44	Cluster de différenciation 44
	CPA	Cellules présentatrices d'Antigènes
	CryoMEB	Cryomicroscopie électronique à balayage
	CSC	Cellules souches cancéreuses
<hr/>		
D	DDS	Drug delivery system
	DEO	1,2,7,8-diepoxyoctane
	DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
	DM	Dispositif médical
	DMDIV	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	DMSO	Diméthylsulfoxyde
	DPS	Décision de police sanitaire
	DVS	Divinyl sulfone
<hr/>		
E	EGFR	Epidermal growth factor receptor
	EMA	European medicines agency
	EPR	Electron paramagnetic resonance
	EU	Union européenne
<hr/>		
F	FDA	Food and drug administration
	FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<hr/>		
G	G'	Module de conservation
	G''	Module de perte
	G*	Module complexe
	GAG	Glycosaminoglycane
	GlcA	Glucuronic acid
	GlcNac	N-acétylglucosamine
	GPI	Glycosylphosphatidylinositol
	GPMT	Guinea pig maximization test
	GRAS	Generally recognized as safe
	GT	Glycosyltransférase

H	HA	Hyaluronic acid
	HARE	Hyaluronan receptor for endocytosis
	HAS	Acide hyaluronique synthase
	HAS	Haute autorité de santé
	HA-Si	Acide hyaluronique silanisé
	HLB	Balance hydrophile-lipophile
	HMDA	Hexamethylenediamine
	HMMR	Hyaluronan-mediated motility receptor
	HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose
	HYAL	Hyaluronidase
I	ICH	International council for harmonisation
	ICTV	International committee on taxonomy of viruses
	IFN- γ	Interferon gamma
	IL	Interleukine
	INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
	IR	Infrarouge
	ISO	International organization for standardization
	IUPAC	International union of pure and applied chemistry
K	Km	Constante de Michaelis
L	LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
	LS	Liquide synovial
	LPS	Lipopolysaccharide
	LXA4	Lipoxine A4
M	M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
	MDR	Medical device regulation
	MEC	Matrice extracellulaire
	MHS	Mark-Houwink-Sakurada
	MMP	Matrix metalloproteinase
	MPC	Matrice ou Manteau péri-cellulaire
	MPO	Myélopéroxydase
	MUC5AC	Mucine 5AC
	M_w	Poids moléculaire
N	NF- κ B	Facteur nucléaire κ B
O	o-AH	Oligomère de l'acide hyaluronique
	OD	Densité optique
	OMS	Organisation mondiale de la santé
	ORF	Open reading frame
	OVDs	Ophtalmic viscosurgical devices

P	PBCV-1	Paramecium Bursaria chlorella virus type 1
	PCR	Polymerase chain reaction
	PEGDE	Polyethylene glycol diglycidyl ether
	pH	Potentiel hydrogène
	PIP	Poly implant prothèse
	pKa	Constante d'acidité
	PTH	Hormone parathyroïdienne
R	RANK	Récepteur activateur du NF-kB
	RANKL	RANK-Ligand
	RCF	Force centrifuge relative
	RHAMM	Receptor for HA-mediated motility
	RMES	Regenerative medicine and skeleton
	RMN ¹³ C	Résonnance magnétique nucléaire du carbone 13
	RMN ¹ H	Résonnance Magnétique nucléaire du proton
	ROS	Reactive oxygen species
S	SDM	Système de délivrance de médicament
	SEC	Size exclusion chromatography
	SI	Système international
	SMR	Service médical rendu
	SPAM1	Sperm adhesion molecule 1
	SPM	Specialized pro-resolving mediators
T	TAM	Macrophages associés aux tumeurs
	TGF-β1	Tumor growth factor-β1
	TLR	Toll-like Receptors
	TSG-6	Tumor necrosis factor-α stimulated gene 6
U	UDP	Uridine diphosphate
	UDP-GlcA	UDP-acide glucuronique
	UDP-GlcNac	UDP-N-acétylglucosamine
	UE	Union européenne
	UGDH	UDP-glucose déshydrogénases
	UGP	UDP-glucose pyrophosphorylase
	US	États-Unis
	USP	United-States Pharmacopeia
	UTP	Uridine triphosphate
	UV	Ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition en pourcentage de l'acide hyaluronique dans différents tissus de l'organisme humain (3).	20
Figure 2 : Schéma d'une articulation normale avec les différentes cellules et éléments de la membrane synoviale, elle-même comprise à l'intérieure d'une membrane fibreuse, la capsule articulaire (6).	21
Figure 3 : Illustration du revêtement à la surface du cartilage articulaire formé par l'association de l'acide hyaluronique (HA) avec des molécules de Lubricine et des couches de Phosphatidylcholine (PC) exposant leur groupement phosphocholine hautement hydratés (11).	21
Figure 4 : Surface cellulaire de la bactérie <i>S. Pyogenes</i> avec sa capsule d'acide hyaluronique (12).	22
Figure 5 : Schéma de la synthèse de l'acide hyaluronique dans une cellule de plante transgénique après insertion du gène HAS. d'après Arezoo Nazeri et al. (15).	23
Figure 6 : Comparaison des mécanismes d'intégration dans une cellule bactérienne entre un plasmide non-intégrant (en haut) et un plasmide épisomal (en bas). 1. ADN chromosomique. 2. Plasmides. 3. Division cellulaire. 4. ADN chromosomique avec intégration du plasmide épisomal (19).	24
Figure 7 : Biosynthèse de l'acide hyaluronique par le virus PBCV-1 dans une cellule de <i>Chlorelle</i> infectée (22).	26
Figure 8 : Structure moléculaire d'unités disaccharidiques d'acide glucuronique et N-acétylglucosamine formant une molécule d'acide hyaluronique avec numérotation (en rouge) de la position des atomes de carbone de chaque saccharide (18).	27
Figure 9 : Structure chimique d'un tétra-saccharide d'HA dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) contenant de l'eau (24,25)	28
Figure 10 : Structures primaire et secondaire de l'AH, d'après E.V. Shikina, R.A. Kovalevsky, A.I. Shirkovskaya et Ph.V. Toukach (16).	28
Figure 11 : Intervalles de poids moléculaires d'acide hyaluronique issu de différentes sources. 1 - <i>S. equi ssp. equi</i> , 2 - <i>S. iniae</i> , 3 - <i>Lactobacillus acidophilus</i> , 4 - <i>Streptomyces albulus</i> , 5 - <i>Agrobacterium</i> , 6 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 7 - <i>Kluyveromyces lactis</i> , 8 - <i>Pichia pastoris</i> (16)	29
Figure 12 : formation d'un gel après ajout d'eau à l'une des extrémité d'une feuille d'acide hyaluronique (37)	30
Figure 13 : Variation de la viscosité du hyaluronate de Na de masse molaire moyenne en masse ($M_w = 1,3 \cdot 10^6$ g/mol) en fonction du taux de cisaillement et de sa concentration dans une solution de NaCl 0,1 M à 25 °C (43)	31
Figure 14 : Courbes maîtresses de G' et G'' en fonction de la fréquence (ω) obtenues par translation en utilisant comme référence les courbes $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ du HA à 39,9g/L ($M_w = 1,3 \times 10^6$; $T=25^\circ\text{C}$). Modifiée à partir de la référence (43)32	32
Figure 15 : Mécanismes d'hydrolyse de l'acide hyaluronique en condition acide. Les différents sites d'attaque des protons sur le résidu d'acide glucuronique et les réactions correspondantes sont numérotées (1)-(3). (45)	34
Figure 16 : Mécanismes d'hydrolyse de l'acide hyaluronique en condition alcaline. A - Mécanisme réactionnel en deux étapes avec clivage de la liaison glycosidique. B - Mécanisme réaction en une seule étape avec clivage de la fonction amide (N-Acetyl). (45).	34
Figure 17 : Réactions photochimiques possibles après exposition UV de l'acide hyaluronique. Modifiée à partir de la référence (46)	35

Figure 18 : Influence des rayons γ sur le chromatogramme de l'acide hyaluronique en poudre ou en solution après exposition à une dose de 6 kGy (47).....	35
Figure 19 : Dépolymérisation de l'acide hyaluronique en solution dans l'eau (0,1% m/v) par chauffage conventionnel et par micro-ondes en fonction du pH. (L'axe en ordonnée " $M_r \times 10^{-3}$ " correspond à la masse moléculaire relative, il s'agit de la masse moléculaire divisée par 1 uma et s'exprime donc sans unités) (48).	36
Figure 20 : Schéma des processus de chauffage conventionnel et de chauffage par micro-ondes (49).	36
Figure 21 : Chromatogrammes de solutions d'acide hyaluronique (2,37 mg/mL) soumis aux ultrasons pendant 0 min (HA), 15 min (SON-1), 45 min (SON-2) et 60 min (SON-3) à l'aide d'un appareil de nettoyage à ultrasons de faible puissance (51).	37
Figure 22 : Schémas de la structure d'une unité disaccharidique (A), de la structure prédictive d'une HAS de mammifère dans la membrane plasmique (B) et proposition du processus de biosynthèse d'une molécule l'acide hyaluronique par une HAS (en rouge) au travers de la membrane plasmique (C) (54).....	38
Figure 23 : Synthèse de l'acide hyaluronique chez <i>Streptococcus equi</i> . L'enzyme HasA est formée de six domaines transmembranaires impliqués dans la polymérisation et l'exportation de l'acide hyaluronique. Modifiée à partir de la référence (55).	39
Figure 24 : Réaction d'hémiacétalisation du monomère N-Acétyleglucosamine et mise en évidence de l'extrémité réductrice correspondant au groupe Hydroxyle libre sur le Carbone C1. Par Segeron F.	39
Figure 25 : Structure du récepteur CD44 et organisation génomique (68). Les cases blanches représentent les 10 exons pouvant être soit épissés pour obtenir les récepteur CD44s soit conservés selon différentes combinaisons pour obtenir les autres types de CD44v. L'exon 17 « TM » correspond au domaine transmembranaire, hautement conservé entre les différentes isoformes de CD44.....	42
Figure 26 : Organisation de l'acide hyaluronique in vivo : A - Formation de « câbles » entre des monocytes avec en vert, l'AH ; en rouge, le CD44 et en bleu, le noyau cellulaire (71). B - MPC autour d'une cellule cancéreuse MCF-7 C avec l'AH et HAS3 en vert. C - MPC autour d'une cellule cancéreuse MCF-7 entourée de cellules hématopoïétiques en vert, de l'AH en rouge et de la protéine HAS3 en vert (72).	43
Figure 27 : Proposition de l'interaction entre le récepteur RHAMM à la surface cellulaire avec l'acide hyaluronique et l'activation de ses fonctions intra et extracellulaire (73)	44
Figure 28 : A Organisation moléculaire de l'acide hyaluronique dans la MEC (5) B : Schéma de la structure entre les agrécanes (protéoglycane du cartilage articulaire) et l'acide hyaluronique (2)	45
Figure 29 : Structure de la peau et de l'épiderme (75).	46
Figure 30 : Comparaison entre une peau « jeune » et une peau « mature » (78).	47
Figure 31 : Proposition des rôles de l'acide hyaluronique (AH) et ses fragments dans l'os : Modélisation schématique des rôles de l'AH dans le recrutement des ostéoblastes (OB) depuis les cellules progénitrices stromales de la moelle osseuse (bmSC) ainsi que dans la minéralisation et la formation osseuse. Rôles de l'AH intact de haut poids moléculaire (HA) et des oligosaccharides de bas poids moléculaire (o-HA) dans la médiation de la résorption osseuse par les ostéoclastes (OC) via RANK et RANKL ainsi que leur rôle dans l'angiogenèse des cellules endothéliales (EC) (56).	49

Figure 32 : Rôle de l'acide hyaluronique dans l'angiogenèse. L'angiogenèse implique des cellules endothéliales locales et des progéniteurs endothéliaux (PEC) mobilisés à partir de la moelle osseuse. Les longues chaînes d'AH (N-AH) se fixent aux cellules endothéliales et induisent leur quiescence. Dans les sites de néovascularisation, les courtes chaînes de AH (o-AH) se fixent à leurs récepteurs, qu'ils peuvent également « clustériser » (regrouper), et induisent des signaux mitotiques et migratoires (83).	50
Figure 33 : Mécanismes intracellulaire des oligomères d'AH via les récepteurs cellulaires CD44 et RHAMM induisant la prolifération et la mobilisation cellulaires nécessaire à la mise en route de la cicatrisation (5,98)	52
Figure 34 : Rôle de l'acide hyaluronique dans le rolling leucocytaire via son récepteur CD44 (106)	54
Figure 35 : Description graphique du processus de production de l'acide hyaluronique par fermentation de <i>S. zooepidemicus</i> d'après le brevet déposé par Swann et al. D.O.T : Dissolved Oxygen Tension, HA : Hyaluronic Acid, D.C.W : Dry Cell Weight (129)	60
Figure 36 : Schéma d'un chemostat illustrant un mode d'alimentation continue (131)	60
Figure 37 : Synthèse chimio enzymatique de l'acide hyaluronique. A : Absence de précurseur avec une initiation lente de la polymérisation de durée plus ou moins longue dû à la liaison des précurseurs avec l'enzyme (short lag / long lag). B : Présence d'un accepteur permettant d'éviter la phase d'initiation lente et de synchroniser la polymérisation des polysaccharides. C : Augmentation de la quantité d'accepteurs par rapport à la quantité d'enzyme permettant d'obtenir des fragments plus courts (145)	62
Figure 38 : Schéma d'une molécule d'acide hyaluronique réticulé par un agent réticulant (Crosslinker molecule) avec en (A) création d'un pont entre deux saccharides et en (B) l'agent réticulant lié à un seul saccharide. (148)	64
Figure 39 : Réticulation de l'acide hyaluronique(AH) par le BDDE avec les groupements époxydes entourés en rouge.	65
Figure 40 : Réaction d'identification au Carbazole de l'acide hyaluronique (154)	66
Figure 41 : représentation schématique et formule mathématique de la viscosité dynamique avec dF_T/dS correspondant à la contrainte de cisaillement (rapport de dérivées d'une force sur une surface) et dV/dz correspondant au taux de cisaillement ou gradient de vitesse (rapport de dérivées d'une vitesse sur une distance) (156).	67
Figure 42 : Représentation schématique et formule mathématique du taux de cisaillement avec $\partial v/\partial y$ correspondant au rapport de dérivées partielles d'une vitesse sur une distance (157).	68
Figure 43 : Graphique de la viscosité (mPas) de différentes solutions d'acide hyaluronique de poids moléculaire différents mais de concentration identique (10 mg/mL) en fonction du taux de cisaillement (1/s) sur une échelle logarithmique (158)	69
Figure 44 : Exemple de mesure de viscosité (Log viscosity) d'une solution d'acide hyaluronique en fonction du taux de cisaillement (Log shear rate) sur une échelle logarithmique illustrant un domaine linéaire (sans variation de viscosité) compris entre un log shear rate de -4 à -1 (30).	69
Figure 45 : Détermination graphique de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ de l'acide hyaluronique (30)	70
Figure 46 : Représentation schématique et formule mathématique de la déformation de cisaillement. Par Segeron F.	71
Figure 47 : Rhéomètre DHR de TA Instruments. Figure réalisée et modifiée à partir de (163)	73
Figure 48 : Principe du test d'Ames (166)	74
Figure 49 : Exemples d'applications biomédicales de l'acide hyaluronique (18).	77

Figure 50 : Photographies d'une patiente avant (A) et après (B) injection d'un produit Stylage (Laboratoires Vivacy) mettant en évidence une diminution du marquage des rides du sillon nasogénien (173).....	78
Figure 51 : Produit Laserskin® avec : (a) photographie d'une feuille du produit et (b) photomicrographie montrant la migration des kératinocytes au travers des pores (38).	80
Figure 52 : Stades de lésions du cartilage dans la gonarthrose. 1. cartilage mou, 2. surface rugueuse avec fissures, 3. fissures profondes dans le cartilage allant jusqu'à l'os, 4. usure complète du cartilage avec mise à nu de l'os (177).	80
Figure 53 : Exemples de formulations de systèmes de délivrance de médicament à base d'acide hyaluronique (w = water/phase hydrophile), o = oil/phase lipophile) (193)	83
Figure 54 : Activité de l'acide hyaluronique sur la peau et effets revendiqués selon son poids moléculaire. (TEWL = Transepidermal Water loss ou perte d'eau transépidermique; DEJ = Dermoepidermal junction ou jonction dermo-épidermique)	84
Figure 55 : A - Comparaison de la structure des tissus environnant une dent saine et une dent atteinte de parodontite (210). B - comparaison des tissus internes entre une dent saine et une dent atteinte de pulpite (211).....	90
Figure 56 : Structure moléculaire de la Lipoxine A4 (A : Structure 3D et B : Structure 2D) (217).	91
Figure 57 : Biosynthèse de la Lipoxine A4 à partir de l'AA de la membrane plasmique (AA = Acide Arachidonique ; CYP = Cytochrome P ; EETs = Acide époxyeicosatriénoïque ; GPx = Glutathion peroxydase ; GST = Glutathion S-transférase, HETEs = acides hydroeicosatétraénoïques ; HpETE = Acides hydroperoxy-eicosatétraénoïques ; PLA2 = Phospholipase A2) (218).....	91
Figure 58 : Rôle des Lipoxines dans le processus de l'inflammation (223).	92
Figure 59 : Schéma de la méthode de réticulation d'un hydrogel d'acide hyaluronique silanisé (228).	93
Figure 60 : Structures chimiques du Tween 20 (à gauche) (230) et de l'HPMC (à droite) (231).....	94
Figure 61 : Structure chimique du Poloxamère 188 (234).	101
Figure 62 : Émulsion MPE6 – A : Aspect macroscopique à J0 puis J4. B : Observation en microscopie optique à J0.	104
Figure 63 : Émulsion SE6 – A : Aspect macroscopique à J0 puis J4. B : Observation en microscopie optique à J0.	105
Figure 64 : Aspect macroscopique des émulsions MPE6-HPMC1-6 six jours post fabrication.	105
Figure 65 : A – Aspect macroscopique à J+1 des émulsions MPE6-HPMC1-6 (de gauche à droite) avant et après centrifugation. B – Aspect macroscopique à J+1 des émulsions SE6-HPMC1-6 (de gauche à droite) avant et après centrifugation.	106
Figure 66 : Test de stabilité par centrifugation des émulsions MPE6-HPMC5 et SE6-HPMC5 formulées selon différentes températures avec ou sans tensioactif.	107
Figure 67 : Observation au microscope numérique des émulsions MPE et SE après dilution au 1/10 ^{ème} dans de l'eau purifiée. Émulsion MPE à gauche (A) et émulsion SE à droite (B).	108
Figure 68 : Coloration au Nile Red des émulsions SE et MPE. Aspect macroscopique de l'émulsion MPE (A) et observation de ses globules lipidiques au microscope à fluorescence à J0 (B). Aspect macroscopique de l'émulsion SE (C) et observation de ses globules lipidiques au microscope à fluorescence à J0 (D).	108
Figure 69 : Graphiques de distribution en densité du volume et du nombre des globules lipidiques de l'émulsion MPE (A) et SE (B).....	109

Figure 70 : Observation au microscope numérique et test de stabilité de l'émulsion SE6-HPMC5 formulée avec le Poloxamère 188.	109
Figure 71 : Observation au microscope numérique des hydrogels H-MPE (A) et H-SE (B) après traitement des images en haute résolution (HDR)	110
Figure 72 : Observation en macroscopie à fluorescence de l'hydrogel H-MPE (A) et H-SE (B) fabriqués respectivement à partir des émulsions MPE et SE encapsulant le Nile Red.	110
Figure 73 : Observation en CryoMEB des hydrogels H-MPE (A) et H-SE (B) mettant en évidence la structure des globules lipidiques au sein du réseau formé par l'hydrogel d'acide hyaluronique réticulé.	111
Figure 74 : Données brutes (G' , G'' et $\tan \delta$) et analyse de $\tan \delta$ selon la fréquence pour la détermination du point de gel des hydrogels H-MPE (A) et H-SE (B).	112
Figure 75 : Étude de l'injectabilité des hydrogels H-MPE et H-SE au travers d'aiguille de 18G ou 23G – A : Graphique des données brutes avec la force d'injection en fonction du temps. B : Graphique des forces moyennes calculées à partir de la phase plateau.	113
Figure 76 : Résumé graphique	120
Figure 77 : Endocytose de l'acide hyaluronique par le récepteur HARE permettant sa dégradation par la hyaluronidase de type 1 (HYAL-1) au sein des lysosomes (242).	123
Figure 78 : Classification des différentes classes de hyaluronidases retrouvées chez les eucaryotes et procaryotes – Segeron F.	124
Figure 79 : Clivage des différentes liaisons de l'acide hyaluronique par différentes classes de hyaluronidase. Les flèches vertes indiquent le site de clivage en $\beta 1 \rightarrow 3$ par la hyaluronidase de sangsue (Leeches). Les flèches noires indiquent le site de clivage en $\beta 1 \rightarrow 4$ par les hyaluronidases testiculaires (Testicular) PH20, bactériennes de type lyases et du crabe royal (red king crab) (245).	125
Figure 80 : Mécanisme commun de dégradation de l'acide hyaluronique par les hyaluronidases humaines (244).	127
Figure 81 : Cinétiques de dégradation des gels PNT4 (A) et PNT3 (B) après injection en dose unique ou multidose de hyaluronidases Hylenex®. Pour chaque gel, 5 doses de $38,3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de gel sont injectées et comparées à une dose unique de $191,6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Les lignes en pointillées représentent 10 % du G' initial. (247).	129
Figure 82 : Effet des espèces réactives de l'oxygène sur le cartilage lors d'une inflammation de la membrane synoviale (253).	130
Figure 83 : Schéma réactionnel de la génération d'espèces réactives de l'oxygène dans les neutrophiles (255)	130
Figure 84 : Voies de dégradation possibles de l'acide hyaluronique par le radical hydroxyle à partir du résidu d'acide glucuronique. Modifiée à partir de la référence (255).	132
Figure 85 : Voies de dégradation de l'acide hyaluronique par l'acide hypochloreux à partir du résidu N-acétylglucosamine. Modifiée à partir de la référence (260).	133
Figure 86 : Evolution des modules G' et G'' des produits de viscosupplémentation HYLAN G-F 20 et HANNOX-M-XL en condition de stress oxydatif (H_2O_2). Modifiée à partir de la référence (261).	135
Figure 87 : Dégradation (%) de la viscosité complexe (η^*) et des modules G' et G'' des gels HYLAN G-F-20 et HANNOX-M-XL (261).	135

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Concentrations de l'acide hyaluronique en $\mu\text{g.g}^{-1}$ dans différentes régions anatomiques du corps humain (1,5).	20
Tableau II : Hyaluronan Synthases identifiées chez les humain et les souris avec leur gène associé. D'après Bastow et al. (56).	41
Tableau III : Composition des formulations des émulsion MPE1 à MPE6.	95
Tableau IV : Composition des formulations des émulsions MPE6-HPMC1 à MPE6-HPMC6 avec différentes solutions aqueuses d'HPMC.	96
Tableau V : Composition des formulations de MPE6-HPMC5 selon quatre méthodes de fabrication.	97
Tableau VI : Composition des formulations des émulsions SE6-HPMC1 à SE6-HPMC6.	98
Tableau VII : Étude de l'impact du tensioactif et de la température de fabrication sur la stabilité de MPE6-HPMC5 ...	106
Tableau VIII : Les différentes hyaluronidase et leur cluster retrouvés chez l'homme et la souris (Hyal5 est spécifique de la souris) (56).	126
Tableau IX : Homologies de séquences (%) des gènes des hyaluronidases retrouvées chez l'homme (244).	126
Tableau X : Liste des produits TESOTAL [®] . Le module de conservation est mesuré à 25 °C à une fréquence de 1 Hz. Le degré de modification est mesuré par RMN ¹ H (résonance magnétique nucléaire du proton) (247).	128

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Classification des espèces vivantes d'après l'encyclopédie Larousse

ANNEXE II : Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG)

ANNEXE III : Spectre des ondes électromagnétiques

ANNEXE IV : Pharmacopée Européenne 11^{ème} édition – Monographie du hyaluronate de Na

ANNEXE V : Liste des produits injectables de comblement des rides déclarés en France

PUBLICATION

Guyon L, Tessier S, Croyal M, Gourdel M, Lafont M, Segeron F, Chabaud L, Gautier H, Weiss P, Gaudin A. **Influence of physico-chemical properties of two lipoxin emulsion-loaded hydrogels on pre-polarized macrophages: a comparative analysis.** *Drug Deliv Transl Res*. Published online April 2, 2024.

INTRODUCTION GENERALE

L'acide hyaluronique (AH) est une molécule dont l'histoire remonte au début du XX^{ème} siècle. Elle a été découverte initialement par le biochimiste Karl Meyer et son étudiant John Palmer en 1934. Cette substance a été extraite à partir du corps vitré ou (humeur vitrée) de l'œil bovin et a d'abord été appelée « hyaluronate » en référence à la hyaloïde, la membrane transparente de l'œil entourant le corps vitré. Son nom actuel, acide hyaluronique, provient du grec « hyalos » signifiant vitreux et du suffixe « uronique » du fait de sa teneur importante en acide uronique.

Les premières recherches sur l'AH ont porté sur son rôle dans les tissus conjonctifs et les yeux. C'est alors que sa présence dans de nombreux tissus du corps, notamment la peau et les articulations, a été découverte.

Au fil des décennies, des applications médicales ont pu être développées par exemple pour le traitement de l'arthrose afin de lubrifier les articulations et réduire les douleurs associées à cette pathologie. Dans les années 1990, l'AH commence à gagner en popularité dans l'industrie cosmétique. En effet, les premiers produits de soin de la peau contenant de l'AH ont été développés dans le but d'hydrater et rajeunir ce tissu. Ensuite, dans les années 2000, l'AH devient un ingrédient clé de la chirurgie esthétique. Des injections sont réalisées pour le comblement de rides, restaurer le volume perdu, améliorer l'apparence du visage et lui redonner son élasticité. Aujourd'hui, ses applications continuent de s'élargir dans divers domaines tels que la chirurgie ophtalmique, la dentisterie ou encore la chirurgie plastique.

Actuellement, les recherches sur l'AH se poursuivent afin de mieux comprendre ses propriétés et ses applications potentielles. De nouvelles techniques d'administration et de formulations sont explorées comme la réticulation avec différents agents chimiques. La réticulation permet de former un réseau entre les molécules d'AH et de créer des matrices capables d'encapsuler des molécules ou des cellules en vue d'une application médicale. Ces techniques de réticulation permettent également de moduler les propriétés physico-chimiques en augmentant la longévité de l'acide hyaluronique dans le corps, une propriété intéressante en chirurgie esthétique permettant de diminuer la fréquence des administrations.

Aujourd'hui, l'AH est largement utilisé dans le domaine de la médecine esthétique et de la cosmétique pour ses propriétés hydratantes et volumatrices. En raison de sa biocompatibilité, sa capacité à retenir l'eau et les possibilités de modulation de sa structure, de nombreuses études sont en cours pour rechercher de nouvelles applications médicales et de nouvelles formulations de médicaments.

Au cours de ce manuscrit, une première partie bibliographique abordera des généralités et des prérequis afin de visualiser dans un premier temps sa répartition dans le monde vivant. Ensuite, ses caractéristiques et fonctions biologiques dans le corps humain seront étudiées.

Dans une seconde partie, les méthodes de production de cette molécule seront abordées et sa place dans le monde de la santé sera ensuite présentée en passant par ses utilisations dans le dispositif médical, le médicament et les produits cosmétiques. Les réglementations correspondantes à ces différents domaines seront également présentées afin de comprendre quels textes et organismes sont chargés de faire respecter la **sécurité**, la **qualité** et l'**efficacité** des produits de santé pouvant contenir cette molécule.

Au travers de mon parcours étudiant et de mon année de spécialisation sur les biothérapies, j'ai eu l'opportunité de travailler sur un projet de recherche à l'INSERM au sein de l'UMR1229. Ces travaux feront l'objet d'une troisième partie expérimentale, traitant de la formulation et du développement d'un système de délivrance de médicament, destiné à une application en chirurgie dentaire.

Enfin, j'ai également pu acquérir une expérience R&D dans le domaine du dispositif médical concernant la dégradation de produits à base d'acide hyaluronique. Cette expérience me permettra d'aborder dans une quatrième et dernière partie, les mécanismes de dégradation radicalaire et enzymatique de ce polymère.

CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE, GENERALITES ET PREREQUIS

1 Présence de l'acide hyaluronique dans le monde vivant

1.1 L'acide hyaluronique chez l'homme et les vertébrés

1.1.1 Répartition globale et concentrations dans les différents tissus

L'AH est présent chez l'homme ainsi que l'ensemble de vertébrés de manière ubiquitaire (1,2). Spécifiquement chez l'homme, on le retrouve avec une concentration moyenne d'environ 200 mg/kg soit 12 g pour un adulte de 60 kg. Il est principalement contenu dans la matrice extracellulaire (MEC) (3). On le retrouve en forte proportion dans la peau et les tissus conjonctifs (**Figure 1**) en participant entre autres au maintien de leur hydratation et de leur structure.

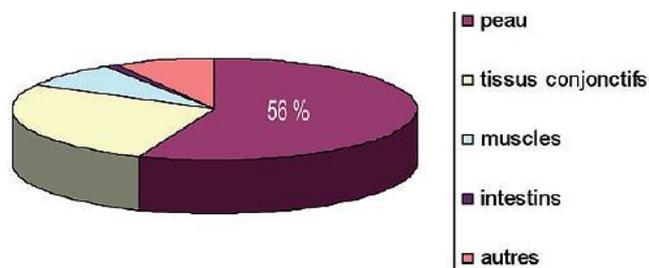


Figure 1 : Répartition en pourcentage de l'acide hyaluronique dans différents tissus de l'organisme humain (3).

D'après le tableau ci-dessous (**Tableau I**), sa concentration est la plus élevée dans le cordon ombilical puis dans le liquide synovial. A titre de comparaison, sa concentration dans une crête de coq est de 7500 mg/L (4,5). Concernant le derme (ou plus largement la peau), comme il s'agit du tissu le plus important en proportion, sa concentration en AH correspond environ à celle retrouvée en moyenne dans le corps humain.

Région anatomique	Concentration en $\mu\text{g.g}^{-1}$
Cordon ombilical	4100
Liquide synovial	1400 à 3600
Derme	200 à 500
Humeur vitrée (Corps vitré)	140 à 340
Cerveau	35 à 115
Liquide Amniotique	20
Lymphes Thoraciques	8,5 à 18
Humeur aqueuse (Chambre antérieure)	0,3 à 2,2
Urine	0,1 à 0,3
Liquide Cérébrospinal Lombaire	0,02 à 0,32
Plasma (Sérum)	0,01 à 0,1

Tableau I : Concentrations de l'acide hyaluronique en $\mu\text{g.g}^{-1}$ dans différentes régions anatomiques du corps humain (1,5).

1.1.2 Exemple de son implication dans l'articulation synoviale

L'AH joue un rôle particulièrement important dans la lubrification dans l'articulation synoviale (**Figure 2**) en étant présent de le **liquide synovial** (LS). Le LS est un liquide résultant d'un dialysat de plasma avec une densité proche de l'eau (1,010), peu abondant (environ 1 mL dans l'articulation du genou par exemple) clair, transparent, incoagulable et visqueux avec un aspect de blanc d'œuf (6). Sa viscosité est en partie dû à la présence d'AH synthétisé par les synoviocytes B de la membrane synoviale (7). Les deux autres types de cellules (A et C) présentes dans la membrane synoviale ont soit un rôle phagocytaire (type A), soit un rôle intermédiaire (type C) entre synthèse et phagocytose (6).

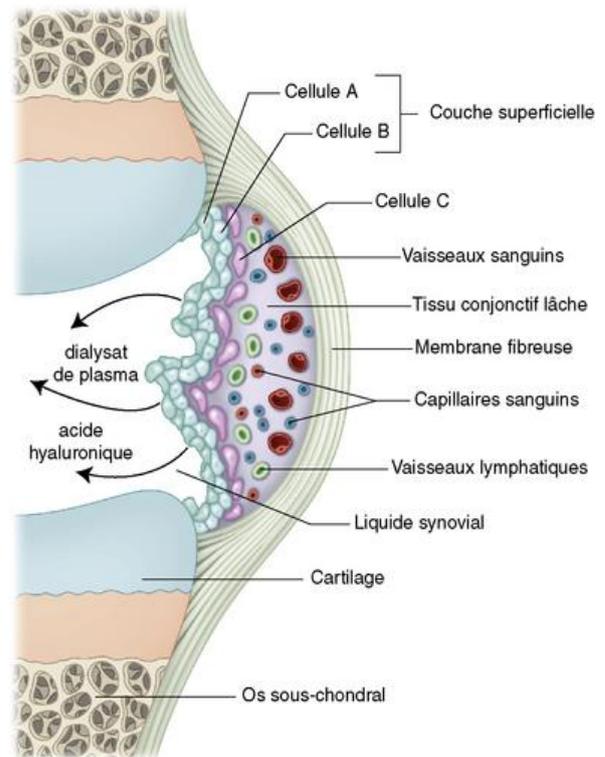


Figure 2 : Schéma d'une articulation normale avec les différentes cellules et éléments de la membrane synoviale, elle-même comprise à l'intérieur d'une membrane fibreuse, la capsule articulaire (6).

Lorsque l'AH est seul, la lubrification du cartilage articulaire n'est pas pleinement assurée (8,9). Pour que cette lubrification ait lieu, l'AH doit être complexé avec d'autres molécules telles que la **Lubricine** (10), une glycoprotéine mucineuse sécrétée dans le LS par les synoviocytes, eux-mêmes présents à la surface du cartilage. L'AH est également complexé à des lipides telle que la **Phosphatidylcholine** (PC). Ces différents éléments forment un revêtement (**Figure 3**) à la surface du cartilage permettent de diminuer les phénomènes de friction avec le cartilage opposé.

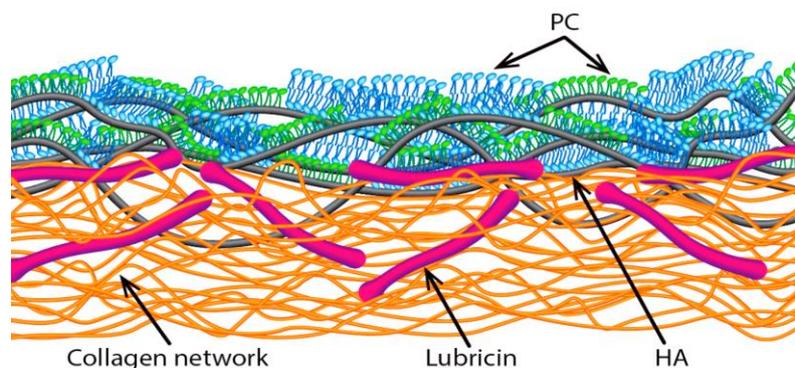


Figure 3 : Illustration du revêtement à la surface du cartilage articulaire formé par l'association de l'acide hyaluronique (HA) avec des molécules de Lubricine et des couches de Phosphatidylcholine (PC) exposant leur groupement phosphocholine hautement hydratés (11).

1.2 L'acide hyaluronique dans le règne bactérien

L'AH peut être retrouvé au sein de bactéries en formant une capsule (**Figure 4**) autour du micro-organisme (12). Par exemple, cette structure est retrouvée au sein du genre *Streptococcus* de type β -hémolytiques telle que la bactérie *S. Pyogenes* (streptocoque A, d'après la classification de Lancefield). La production de l'AH par cette bactérie est assurée par l'opéron **hasABC** où le premier gène **hasA** code pour une acide hyaluronique synthase (HAS). Les autres gènes **hasB** et **hasC** codent pour d'autres enzymes, non essentielles à la synthèse de l'AH de la capsule (13).

Cette capsule d'AH constitue un facteur de virulence et permet aux bactéries de résister à la phagocytose comme ont pu le démontrer Wessels *et al.* (14). Plus précisément, *Hurst et al.*(13) ont également démontré que cette capsule permet de résister à la phagocytose par les **neutrophiles**. En effet, l'AH constituant la capsule présente une structure identique à celle retrouvée chez l'homme et rend les bactéries immunologiquement inertes. De plus, cette capsule d'AH permet aux bactéries d'adhérer aux cellules de la muqueuse nasopharyngée en interagissant avec le **collagène de type IV** et la **fibronectine** présents dans la MEC.

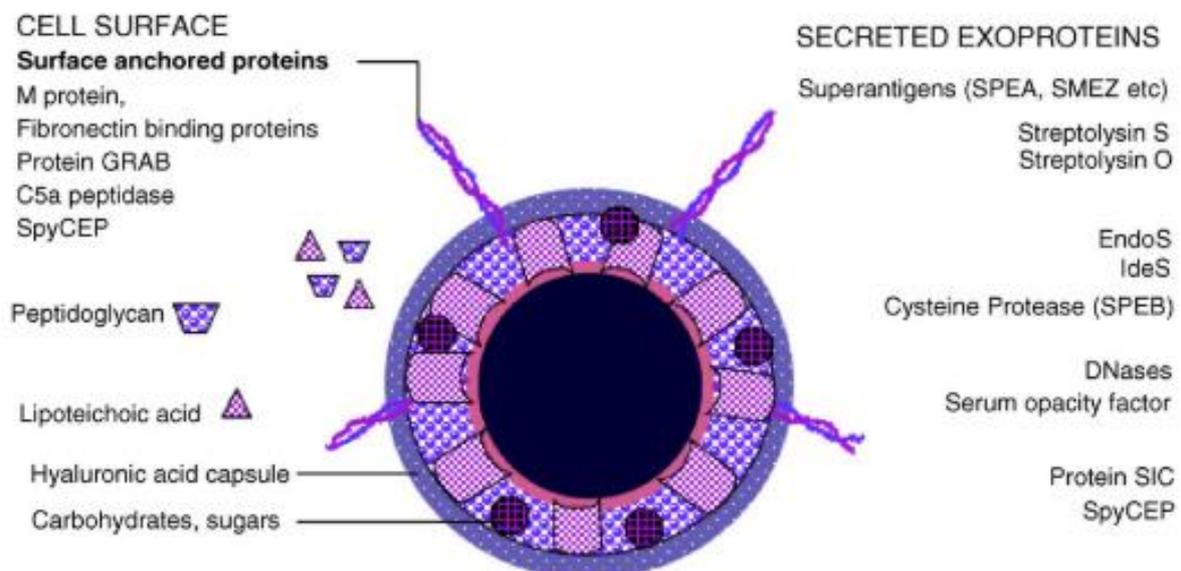


Figure 4 : Surface cellulaire de la bactérie *S. Pyogenes* avec sa capsule d'acide hyaluronique (12).

1.3 L'acide hyaluronique dans le règne végétal et fongique

À l'état naturel, en raison de l'absence des enzymes HAS, l'AH n'est pas retrouvé chez les plantes et les champignons (ou fungi), à l'exception de certaines levures. Cependant, leurs cellules peuvent être modifiées génétiquement afin d'obtenir un système recombinant capable de produire le polymère (15).

1.3.1 Production de l'acide hyaluronique chez les végétaux

Chez les végétaux, seuls les précurseurs UDP (Uridine diphosphate) sont synthétisés à partir du glucose, il s'agit de l'**UDP-N-Acetylglucosamine** (UDP-GlcNac) et de l'**UDP-acide glucuronique** (UDP-GlcA). Pour ensuite synthétiser de l'AH, l'insertion dans les cellules du gène codant pour la HAS est nécessaire (**Figure 5**). Par exemple, l'équipe de Arezoo Nazeri *et al.* (15) sont parvenus à transformer pour la première fois des cellules de racine (« hairy roots ») de *Nicotiana Tabacum* avec le gène **HAS2**. Ce gène code pour une HAS humaine de type 2 et a été inséré à l'aide d'une bactérie Gram négatif, *Agrobacterium rhizogènes*, un agent pathogène des végétaux responsable de la « hairy roots disease ».

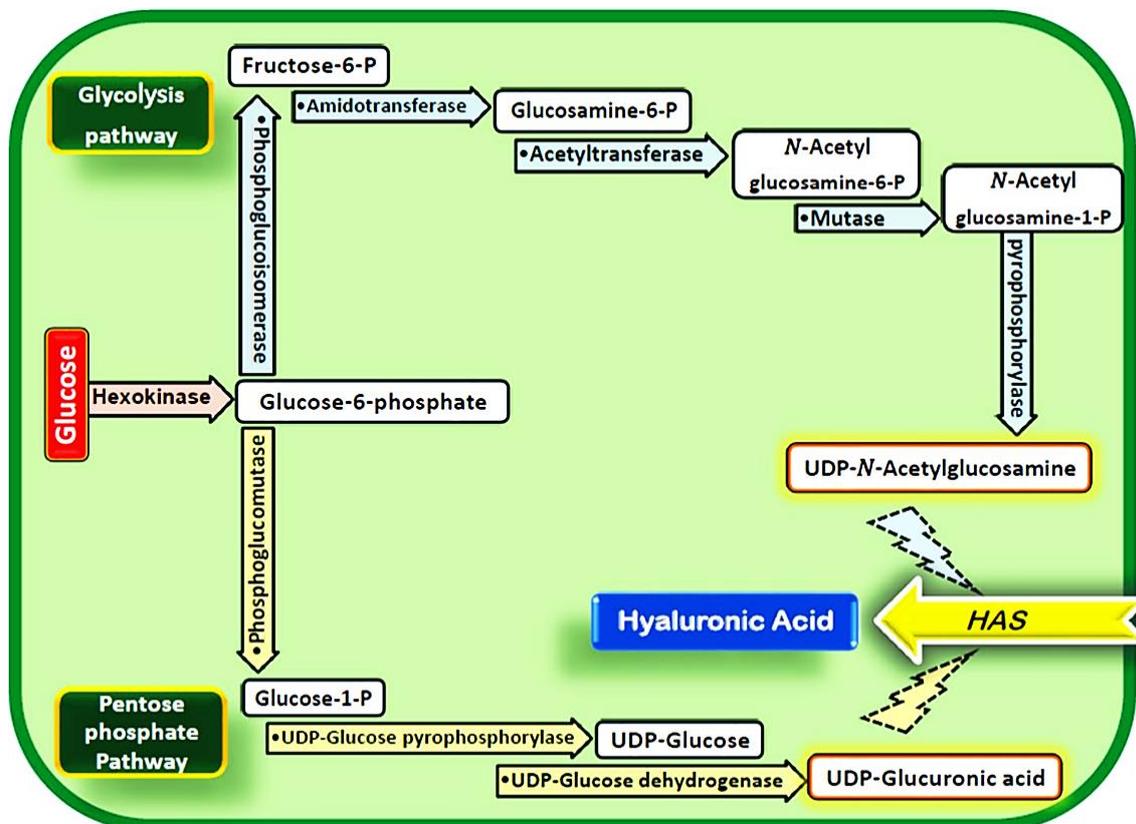


Figure 5 : Schéma de la synthèse de l'acide hyaluronique dans une cellule de plante transgénique après insertion du gène HAS. d'après Arezoo Nazeri *et al.* (15).

1.3.2 Production de l'acide hyaluronique chez les fungus

Chez la plupart des mycètes, telle que la levure *Saccharomyces cerevisiae* (ou plus communément, la levure de boulanger), les précurseurs UDP ne sont pas synthétisés. Une insertion d'un gène codant pour la HAS n'est donc pas suffisant, ces précurseurs doivent être apportés de manière exogène. Concernant *S. cerevisiae*, il s'agit d'une levure particulièrement intéressante pour la production d'AH car elle fait partie des microorganismes GRAS (Generally Recognized As Safe), c'est-à-dire reconnu pour être sans danger. De plus, la FDA (Food and Drug Administration) a déjà approuvé son utilisation pour la production de principes actifs telle que l'artémisinine, un antipaludéen entre autres, ou encore l'émodine (16) aux propriétés antivirale, laxative, immunosuppressive et antitumorale (17)).

En détail, d'après de Oliveira *et al.* (18), la modification génétique de la levure *S. cerevisiae* se fait par l'insertion du gène **DG42** à l'aide du plasmide **pYES2**. Ce gène code une hasA provenant d'amphibiens du genre *Xenopus*. Le plasmide pYES2 est un plasmide « épisomal », c'est-à-dire capable de s'intégrer dans l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) de la cellule hôte (**Figure 6**) et d'être dupliqué à chaque division cellulaire faisant ensuite partie intégrante de son patrimoine génétique.

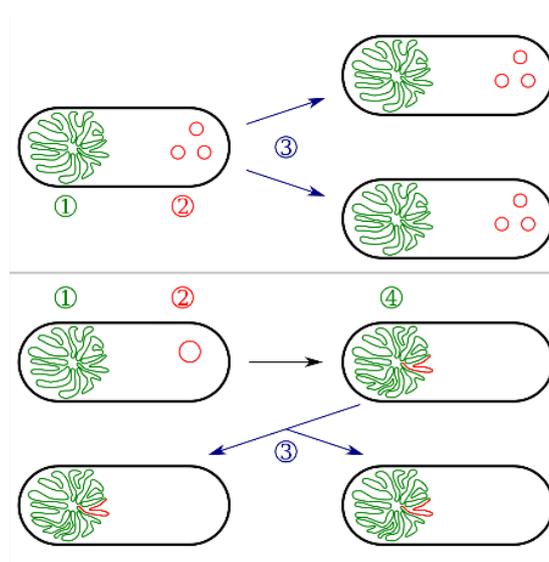


Figure 6 : Comparaison des mécanismes d'intégration dans une cellule bactérienne entre un plasmide non-intégrant (en haut) et un plasmide épisomal (en bas). 1. ADN chromosomique. 2. Plasmides. 3. Division cellulaire. 4. ADN chromosomique avec intégration du plasmide épisomal (19).

Bien que des techniques biotechnologiques (transfection ou transformation entre autres) soient nécessaires la plupart du temps pour produire de l'AH via des levures ou champignons, certaines espèces sont capables de produire ce polysaccharide de manière autonome. Par exemple, chez la levure *Cryptococcus neoformans*, la synthèse d'AH est assurée et catalysée par une glycosyltransférase codée par le gène CPS1 (18).

1.4 Cas particulier de l'acide hyaluronique chez les virus

Bien que les virus ne soient pas compris dans la classification des différents règnes du monde vivant (**Annexe I**), ils restent classés par ordre, famille, sous-famille, genre et espèce d'après l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Leur appartenance au monde du vivant reste encore un débat aujourd'hui. Leur cas est tout de même abordé ici car leur interaction avec les organismes vivants et les découvertes réalisées ont permis de mettre en évidence leur implication dans la production de l'AH.

Par exemple, en s'intéressant au virus **PBCV-1** (Paramecium Bursaria chlorella virus type 1), l'équipe de Paul L. DeAngelis *et al.* (20) a découvert la présence d'une séquence ORF (Open Reading Frame ou Cadre de Lecture Ouvert) A098R codant pour une HAS. En détail, ce virus est un chlorovirus appartenant aux **virus géant** (ou « girus » pour la contraction des termes anglais « giant » et « virus ») dont la taille est supérieure à 0,2 µM et dont le génome contient plus de 300 000 pb (paire de bases).

L'équipe de Paul L. DeAngelis a pu mettre en évidence la production d'AH par des cellules de Chlorelle (une algue verte unicellulaire) infectées par ce chlorovirus. La présence d'autres séquences ORF (A609L et A100R) chez ce virus ont été mises en évidence et codent pour des enzymes nécessaires à la synthèse des précurseurs UDP de l'AH.

A la suite de ces découvertes, les Chlorovirus ont commencé à être utilisés comme outils biotechnologiques pour transformer des cellules végétales. Il s'agit par exemple des travaux qu'ont pu réaliser l'équipe de Numfon Rakkhumkaew *et al.* (21) en transformant des cellules BY-2 de tabac. Pour y parvenir, cette équipe a sélectionné le Chlorovirus Hirosaki (CVH1) et a amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) la séquence ORF codant pour la HAS. L'ADN obtenu par PCR a ensuite été inséré dans un plasmide pour obtenir un vecteur d'expression permettant de transformer les cellules BY-2 pour ensuite produire et exprimer des molécules d'AH à la fois sur la surface des cellules et à l'intérieur d'organites.

La **Figure 7** ci-dessous illustre les travaux réalisés par l'équipe de *Paul L. DeAngelis et al.* en mettant en évidence les éléments suivants :

- Activités des enzymes virales A609L et A100R, impliquées dans la production des deux sucres nucléotidiques, UDP- α -D-GlcA et UDP- α -D-GlcNAc, respectivement.
- Synthèse de l'acide hyaluronique catalysée par l'A098R ; cette enzyme nécessite une molécule de GlcNAc comme amorce (« Priming » GlcNAc) pour ajouter d'autres unités monosaccharidiques et allonger la chaîne polysaccharidique à partir de l'extrémité non réductrice (Cf. 3.1 Biosynthèse).
- Images de la paroi cellulaire de *Chlorella* obtenues par microscopie électronique : en haut, algue non infectée ; au milieu, image de la paroi cellulaire prise 240 min post infection ; en bas, paroi cellulaire des algues infectées traitées à la hyaluronidase. "Cyto" indique le cytoplasme de la cellule et "C" la paroi cellulaire. (c)

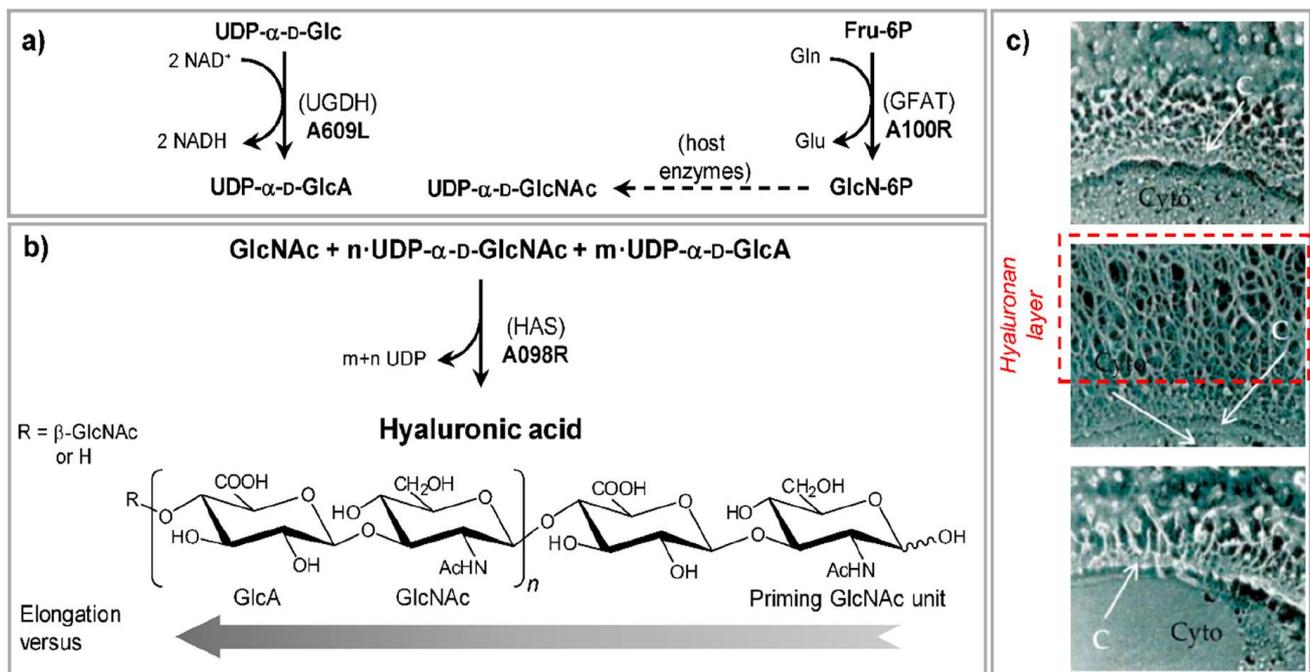


Figure 7 : Biosynthèse de l'acide hyaluronique par le virus PBCV-1 dans une cellule de *Chlorella* infectée (22).

2 Caractéristiques de l'acide hyaluronique

2.1 Structure

2.1.1 Structure chimique

L'AH fait partie des glycosaminoglycanes (GAG) tels que les chondroïtines sulfates, les dermatanes-sulfate, les kératanes-sulfate et les héparanes-sulfate (ou héparines). Il a la particularité d'être le seul GAG non sulfaté et libre dans les tissus, c'est-à-dire non lié à une protéine porteuse (ou centrale) pour former un protéoglycane. Il peut exister soit sous forme acide (acide hyaluronique) soit sous forme de sel (hyaluronate de sodium par exemple).

Comme observé précédemment de manière succincte, l'AH est un polymère composé par la répétition d'un disaccharide d'**acide D-glucuronique** et de **N-acétylglucosamine**. Ces sucres sont liés alternativement par des liaisons osidiques de type $\beta 1 \rightarrow 3$ pour former l'unité disaccharidique et $\beta 1 \rightarrow 4$ entre chaque unité (**Figure 8**). En solution, la taille du motif disaccharidique est estimée à 10 Å (23).

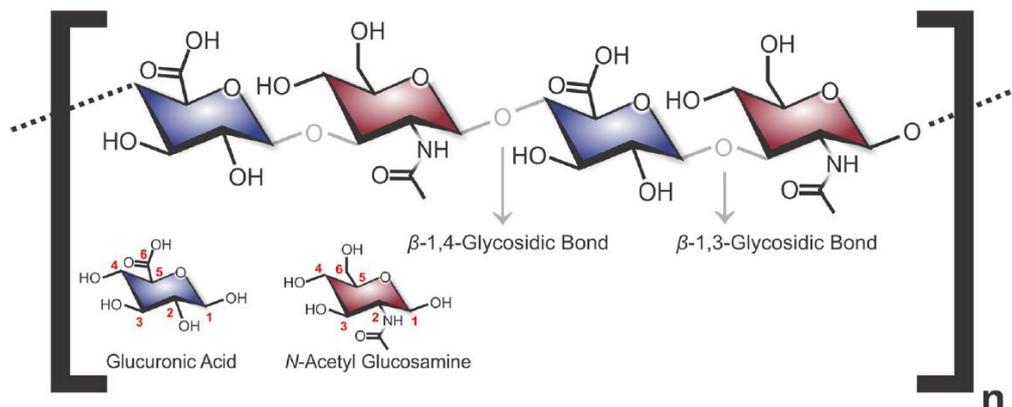


Figure 8 : Structure moléculaire d'unités disaccharidiques d'acide glucuronique et N-acétylglucosamine formant une molécule d'acide hyaluronique avec numérotation (en rouge) de la position des atomes de carbone de chaque saccharide (18).

La configuration β confère aux groupement volumineux (Hydroxyle, carboxyle, acétamide, carbone anomère) une position équatoriale énergétiquement favorable. Quant aux atomes d'hydrogène, de taille bien moins importante, ils occupent la position axiale énergétiquement moins favorable. Cette disposition spatiale permet ainsi au polysaccharide d'avoir une structure énergétiquement stable en limitant la rotation des chaînes polysaccharidiques autour des liaisons glycosidiques. De plus, le polymère est stabilisé par des liaisons hydrogènes (quatre par motif disaccharidique) se formant entre ses différents groupements polaires (alternés par des fractions hydrophobes) ainsi qu'entre des molécules d'eau présentes en solution (24) (**Figure 9**).

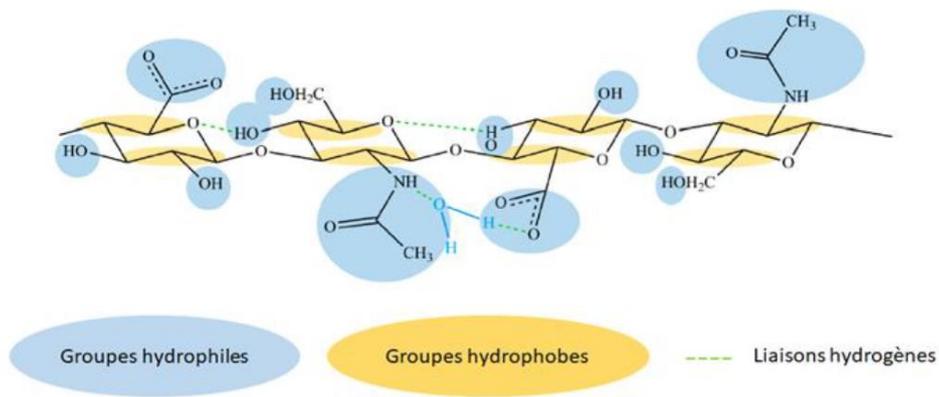


Figure 9 : Structure chimique d'un tétra-saccharide d'HA dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) contenant de l'eau (24,25)

2.1.2 Structure à l'état solide

A l'état solide, ce polyside est semi-cristallin et par analogie avec la structure des polypeptides, sa structure primaire correspond à une chaîne linéaire non ramifiée. Selon son poids moléculaire, le polyside peut adopter une structure secondaire et prendre la forme d'une hélice à un seul brin ou d'une double hélice (**Figure 10**) dans certaines conditions (16). Cette structure hélicoïdale, lui conférant un caractère semi-rigide, est stabilisée par des liaisons hydrogènes (26) et peut varier entre autres selon le contre ion associé (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}). Enfin, l'AH peut adopter une conformation tertiaire avec un agencement entre des hélices et des feuillettes de type β (16,27–29).

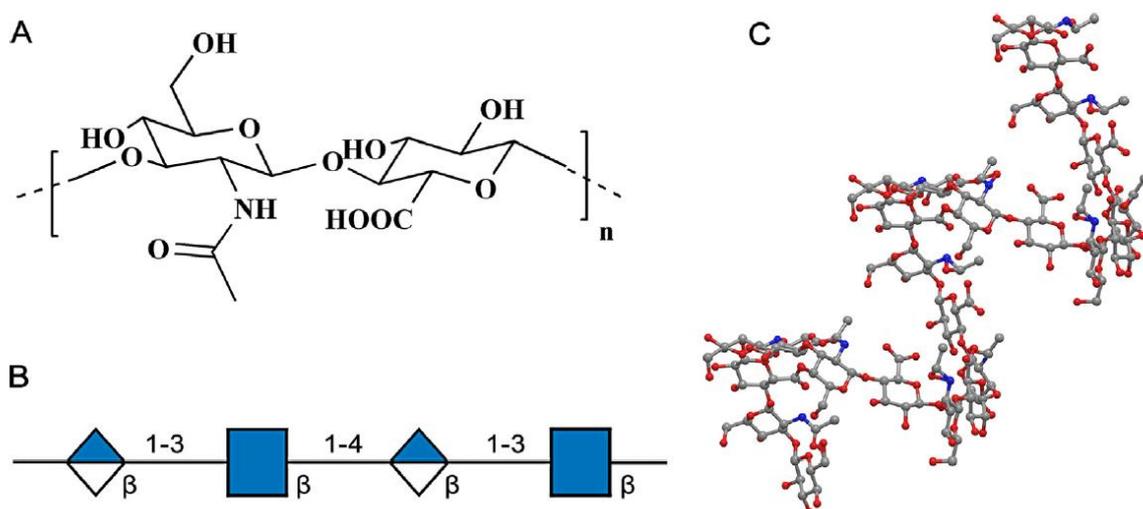


Figure 10 : Structures primaire et secondaire de l'AH, d'après E.V. Shikina, R.A. Kovalevsky, A.I. Shirkovskaya et Ph.V. Toukach (16). (A) structure primaire d'un fragment d'AH. Les chaînes linéaires de l'AH vont de $n = 20$ à $n = 15000$ répétitions (30) ; (B) deux unités répétitives de la structure de l'AH au format SNFG (Symbol Nomenclature For Glycans – Annexe II) (31); (C) modèle 3D d'un fragment en double hélice de l'AH en structure secondaire construite à partir d'unités disaccharidiques répétitives (26).

2.2 Propriétés physico-chimiques

2.2.1 Masse moléculaire et masse molaire

Masse moléculaire (absolue) ou **poids moléculaire (M_w)** : la masse moléculaire d'une molécule correspond à l'expression de sa masse en « unité de masse atomique » (uma) avec 1 uma correspondant au douzième de la masse du noyau du Carbone 12 ou à la masse d'un atome d'hydrogène. En d'autres termes, 1 uma correspond à la valeur approchée de la masse d'un nucléon. En biochimie, l'unité de masse atomique prend le nom de dalton (Da) en l'honneur des travaux de John Dalton sur la théorie atomique.

La longueur des chaînes d'AH peuvent grandement varier *in vivo*. Certaines sources rapportent des poids moléculaires compris entre 10^5 à 10^7 Da avec des longueurs variant de 2 à 25 μm (32) tandis que d'autres sources précisent des poids compris entre $5 \cdot 10^3$ à $2 \cdot 10^7$ Da avec un nombre pouvant atteindre 25 000 répétitions de l'unité disaccharidique (33). Spécifiquement dans le LS sain, son poids moléculaire moyen est de $7 \cdot 10^6$ Da avec une longueur pouvant être supérieure à 15 μm une fois étendu (1). Une dernière source cite un poids moléculaire d'environ 10^6 Da dans le cordon ombilical humain (34).

Concernant le poids moléculaire pouvant être obtenu à l'aide de micro-organismes producteurs, de grandes variations sont observées, qu'il s'agisse de fungi ou de bactéries. Le poids moléculaire obtenu peut varier de plusieurs millions de Da d'un micro-organisme à l'autre (**Figure 11**).

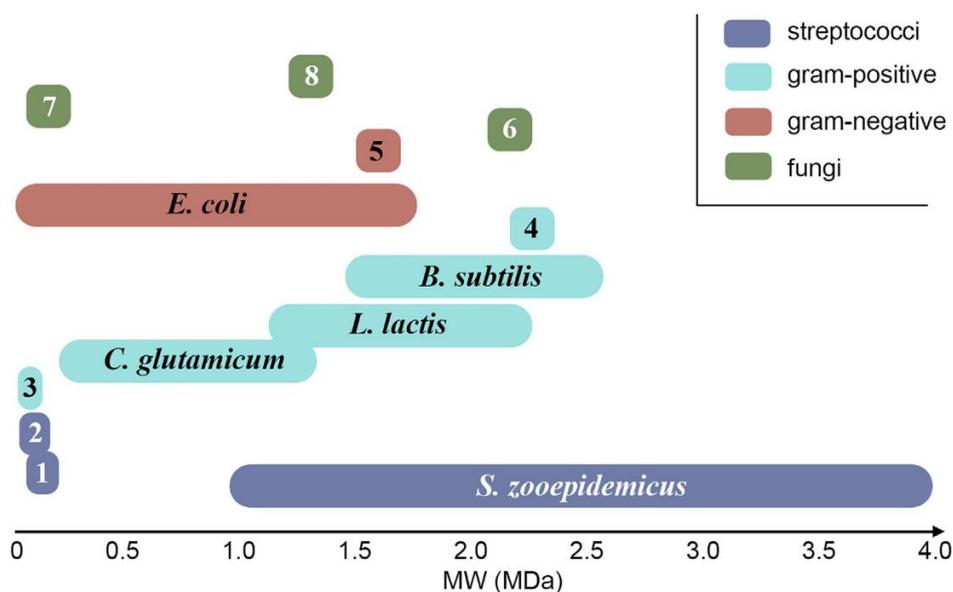


Figure 11 : Intervalles de poids moléculaires d'acide hyaluronique issu de différentes sources. 1 - *S. equi ssp. equi*, 2 - *S. iniae*, 3 - *Lactobacillus acidophilus*, 4 - *Streptomyces albulus*, 5 - *Agrobacterium*, 6 - *Saccharomyces cerevisiae*, 7 - *Kluyveromyces lactis*, 8 - *Pichia pastoris* (16)

Masse molaire (M): La masse molaire d'une molécule correspond à la masse contenant $6,023 \cdot 10^{23}$ exemplaires de cette molécule (soit le nombre d'Avogadro « N_A ») et s'exprime en $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (35).

La masse molaire d'une unité disaccharidique d'acide hyaluronique de formule $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_{11}$ est d'environ $379,318 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ après calcul selon les masses atomiques fournies par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (36). Ainsi, les masses molaires de polysaccharides d'AH peuvent varier de plusieurs millions de $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, de la même manière que leur masse (ou poids) moléculaire.

2.2.2 Solubilité et rhéologie

❖ Solubilité

L'AH a un pKa (constante d'acidité) variant entre 3 et 4 selon son poids moléculaire. En milieu aqueux neutre, cela implique une ionisation de ses fonctions acide carboxylique en carboxylate. L'AH est donc un polysaccharide polyanionique, chargé négativement, accompagné de contre ions monovalents ou bivalents (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , ou Mg^{2+}). Ainsi, l'AH est parfaitement hydrosoluble en formant des sels que l'on appelle hyaluronane ou hyaluronate (24). Il possède un fort pouvoir hygroscopique lui permettant d'absorber jusqu'à 1000 fois son poids en eau et de former des gels viscoélastiques (**Figure 12**).



Figure 12 : formation d'un gel après ajout d'eau à l'une des extrémités d'une feuille d'acide hyaluronique (37)

❖ Propriétés rhéologiques

Les propriétés rhéologiques (viscosité et élasticité entre autres) de l'AH sont influencées par les forces ioniques et le pH (potentiel Hydrogène) avec une disparition de son caractère poly-électrolyte lorsque ce pH devient inférieur à son pKa (38). La longueur des chaînes et autres modifications chimiques sont également des facteurs avec un fort impact sur son élasticité et sa viscosité (39).

En solution basique, les liaisons hydrogènes sont rompues et ne participent plus à l'organisation

structurale de l'AH. De ce fait, la dégradation du polysaccharide est plus importante en milieu basique qu'en milieu acide (40). En solution acide, l'ajout progressif d'acide chloridrique provoque la formation d'un gel à partir d'un pH de 2,5. Cela peut être expliqué par la diminution du degré de dissociation des groupement acides carboxyliques favorisant ainsi les interactions moléculaires telles que les liaisons hydrogènes (41).

La figure ci-dessous (**Figure 13**) met en évidence l'augmentation de la viscosité « η » de l'AH en solution lorsque sa concentration augmente ainsi que son comportement rhéofluidifiant. Ce caractère rhéofluidifiant se traduit par une diminution de sa viscosité lorsque le taux de cisaillement « $\dot{\gamma}$ » appliqué augmente. Ce dernier affecte l'enchevêtrement et les interactions moléculaires (liaisons hydrogène et interactions hydrophobes) provoquant l'alignement des chaînes dans la direction du cisaillement et une chute de viscosité (42). Les solutions d'AH sont donc caractérisées comme des fluides **non-newtoniens pseudo-plastiques**.

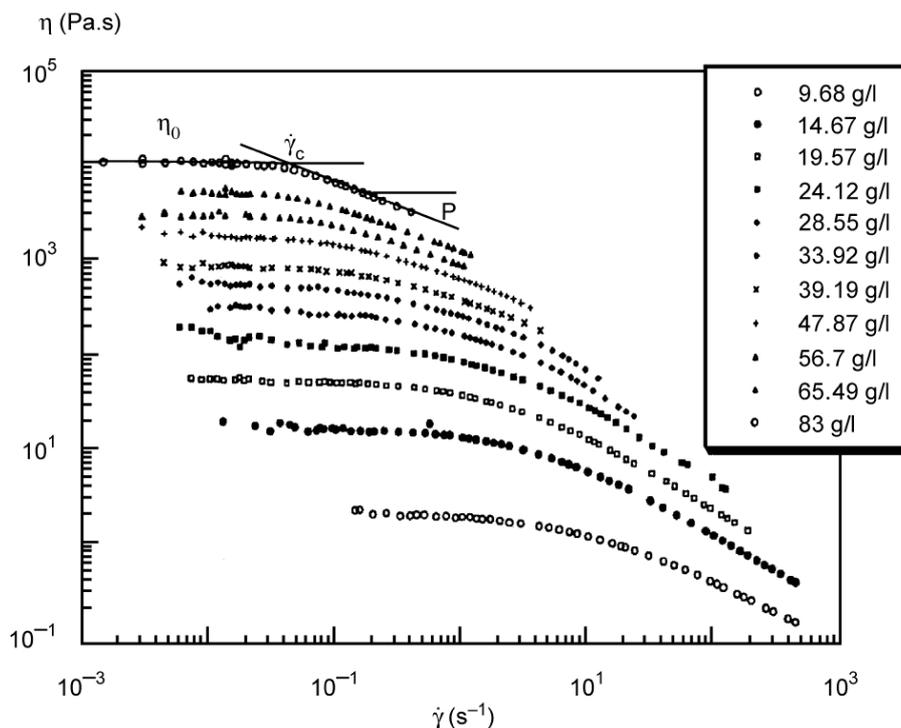


Figure 13 : Variation de la viscosité du hyaluronate de Na de masse molaire moyenne en masse ($M_w = 1,3.10^6$ g/mol) en fonction du taux de cisaillement et de sa concentration dans une solution de NaCl 0,1 M à 25 °C (43)

Ce comportement rhéofluidifiant peut être réversible, c'est-à-dire que la viscosité du fluide pseudoplastique augmente à nouveau lorsque la contrainte qui lui est appliquée diminue. Dans d'autres cas, la modification de la structure du fluide est définitive ou nécessite un certain temps de repos, ce phénomène s'appelle la **thixotropie**. Cela est par exemple le cas lorsqu'un yaourt est battu vigoureusement, devenant liquide au détriment de sa structure initial de gel. Les gels d'AH

(non modifiés chimiquement) sont **non-thixotropes** car ils retrouvent leur viscosité initiale instantanément, indiquant la restructuration rapide des interactions et enchevêtrement détruits par le cisaillement (38).

❖ Comportement viscoélastique

En rhéologie, le comportement viscoélastique d'un fluide ou matériau est caractérisée par la mesure du module de conservation (G') et du module de perte (G'') dont les unités sont exprimées en Pascals « Pa ». Ces deux modules composent le module complexe (G^*) avec $G^* = G' + iG''$ et « i » l'unité imaginaire ($i^2 = -1$). La mesure de ces modules est réalisée à l'aide d'un rhéomètre et varie selon la fréquence à laquelle ils sont mesurés (cf. chapitre II, sous chapitre 1.4.4)

En d'autres mots, lors d'une sollicitation dynamique en cisaillement :

- **Le module « élastique »** (ou plus précisément, module de **conservation**) « G' » correspond à la mesure de la partie réelle de G^* . Il caractérise la rigidité et le comportement élastique d'un matériau capable de restituer l'énergie appliquée et de retrouver sa forme initiale.
- **Le module « visqueux »** (ou plus précisément, module de **perte**) « G'' » correspond à la mesure de la partie imaginaire de G^* . Il caractérise le comportement visqueux d'un matériau et correspond à l'énergie dissipée sous forme de chaleur et à la déformation définitive du matériau.

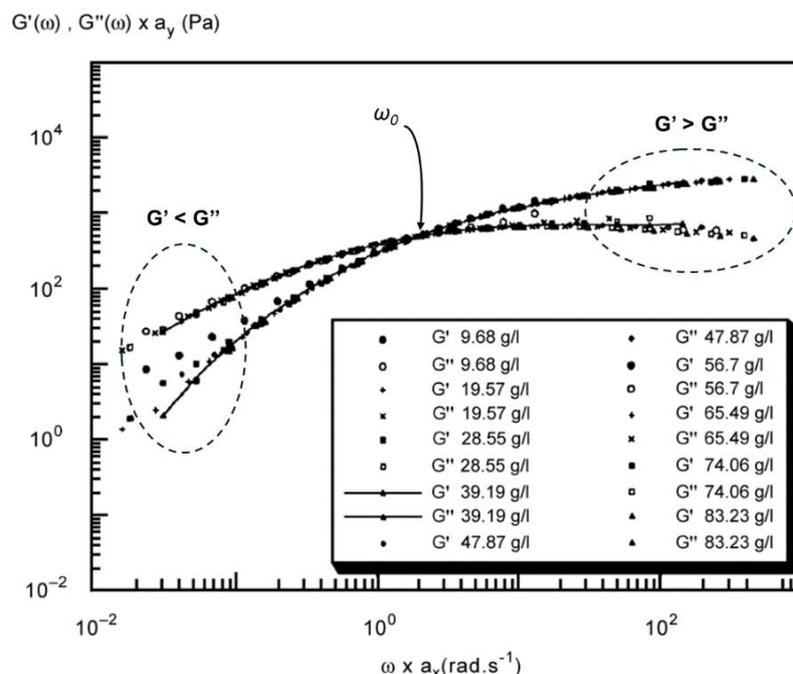


Figure 14 : Courbes maîtresses de G' et G'' en fonction de la fréquence (ω) obtenues par translation en utilisant comme référence les courbes $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ du HA à 39,9g/L ($M_w = 1,3 \times 10^6$; $T=25^\circ\text{C}$). Modifiée à partir de la référence (43)

La **Figure 14** montre le comportement viscoélastique de différentes solutions d'AH de masse molaire $M = 1,3 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Ces courbes sont superposées par translation à l'aide de calculs en utilisant les facteurs de translation « a_y » et « a_x ». La courbe maîtresse étudiée (avec $C_{AH} = 39,19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) permet de rendre compte du comportement visqueux ou élastique du polysaccharide selon la fréquence « ω » appliquée avec un cross-over annoté par « ω_0 » tel que $G' = G''$:

- A basses fréquences, lorsque $\omega < \omega_0$ le comportement de l'AH correspond à celui d'un matériau **visqueux** et $G' < G''$.
- A hautes fréquences, lorsque $\omega > \omega_0$ le comportement de l'AH correspond à celui d'un matériau **élastique** et $G' > G''$.

Il est important de noter que ces mesures sont souvent accompagnées du paramètre $\tan(\delta)$ et permet de rendre compte du caractère plutôt élastique ou visqueux d'un fluide selon la formule :

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$$

2.2.3 Sensibilité à la dégradation par différents agents

❖ Sensibilité aux radicaux libres et à la hyaluronidase

Dans divers organismes, bien que la production d'AH soit permise par des HAS, sa dégradation est également assurée par la présence de hyaluronidases ainsi que de radicaux libres. Ces deux types de sensibilité seront abordées en détail dans le **Chapitre IV**.

❖ Sensibilité à l'hydrolyse alcaline et acide

En 1979, Hofmann *et al.* (44) ont observé qu'aucune hydrolyse n'avait lieu pour des valeurs de pH en-dessous de 2. Ils ont observé par RMN une augmentation du temps de relaxation (Spin-Lattice-Relaxation time T_1) prenant la forme d'une courbe sigmoïde, traduisant une augmentation de viscosité. Ceci pouvant être expliqué par une diminution du degré d'ionisation des groupements carboxyliques, favorisant l'agrégation des molécules d'AH tel que déjà décrit en 2.2.2.

Ensuite, en 1995, Y. Tokita et A. Okamoto (45) ont étudié l'hydrolyse acide et alcaline de l'AH. A l'aide de calculs théoriques, ils avaient prévu que l'hydrolyse **acide** avait lieu sur le résidu **acide glucuronique (Figure 15)** tandis que l'hydrolyse **alcaline** avait lieu sur le résidu **N-acétylglucosamine (Figure 16)**. Les mesures qu'ils ont effectuées par RMN ^{13}C (Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13) sur les produits de dégradation ont confirmées ce que prévoyaient leurs calculs théoriques.

À la suite de leurs travaux, Y. Tokita et A. Okamoto ont pu conclure que :

- L'hydrolyse des chaînes d'AH a lieu de manière aléatoire
- L'hydrolyse acide a lieu sur les résidus acide glucuronique alors que l'hydrolyse alcaline a lieu sur les résidus N-acétylglucosamine
- Le clivage de la liaison glycosidique se fait en une seule étape pour l'hydrolyse acide alors que deux étapes sont nécessaires pour l'hydrolyse alcaline.

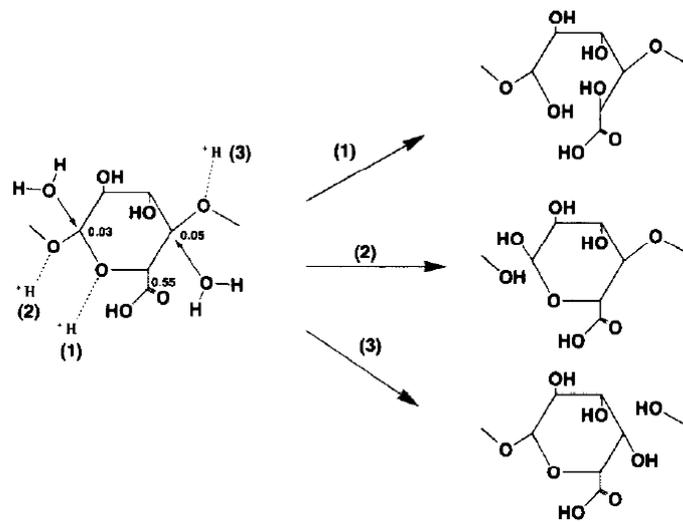


Figure 15 : Mécanismes d'hydrolyse de l'acide hyaluronique en condition acide. Les différents sites d'attaque des protons sur le résidu d'acide glucuronique et les réactions correspondantes sont numérotées (1)-(3). (45)

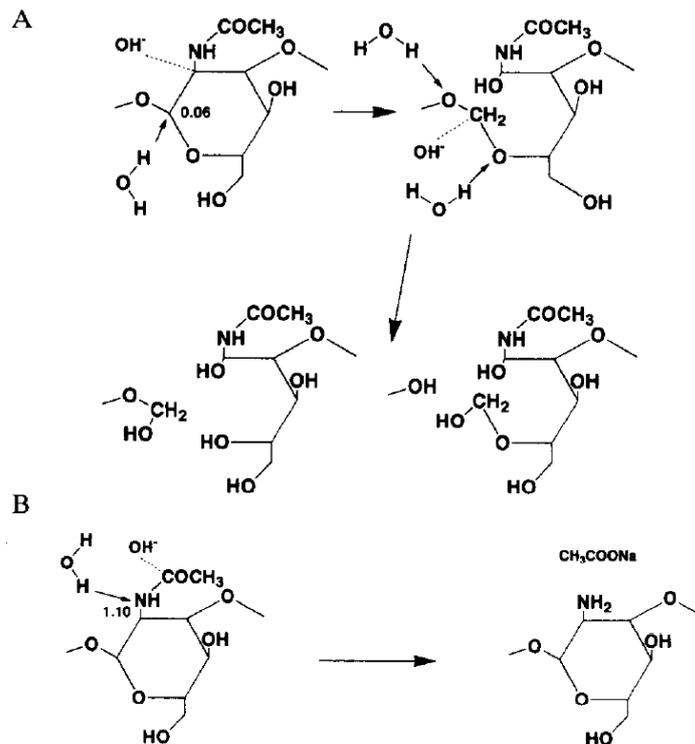


Figure 16 : Mécanismes d'hydrolyse de l'acide hyaluronique en condition alcaline. A - Mécanisme réactionnel en deux étapes avec clivage de la liaison glycosidique. B - Mécanisme réactionnel en une seule étape avec clivage de la fonction amide (N-Acetyl). (45)

❖ Sensibilité à la photo-dégradation ou ondes électromagnétiques (Annexe III)

Rayonnements UV (ultraviolet) : En 1991, Lapčík. *Et al.* (46) ont étudié la dégradation de l'AH soumis aux rayonnements UV par EPR (Electron Paramagnetic Resonance) Spin Trapping, une technique permettant de détecter la présence de radicaux. Après exposition des échantillons à la lumière d'une lampe de mercure (puissance = 500 W ; flux lumineux $\varphi = 7,24 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$; Température = 293 °K), l'équipe de Lapčík Jr. *Et al* ont mis en évidence la formation de radicaux sur des carbones centraux et d'autres hétéroatomes (**Figure 17**). Des analyses complémentaires par SEC (Size Exclusion Chromatography) ont permis de mettre en évidence le clivage des liaisons glycosidiques en observant une diminution du poids moléculaire des fragments d'AH.

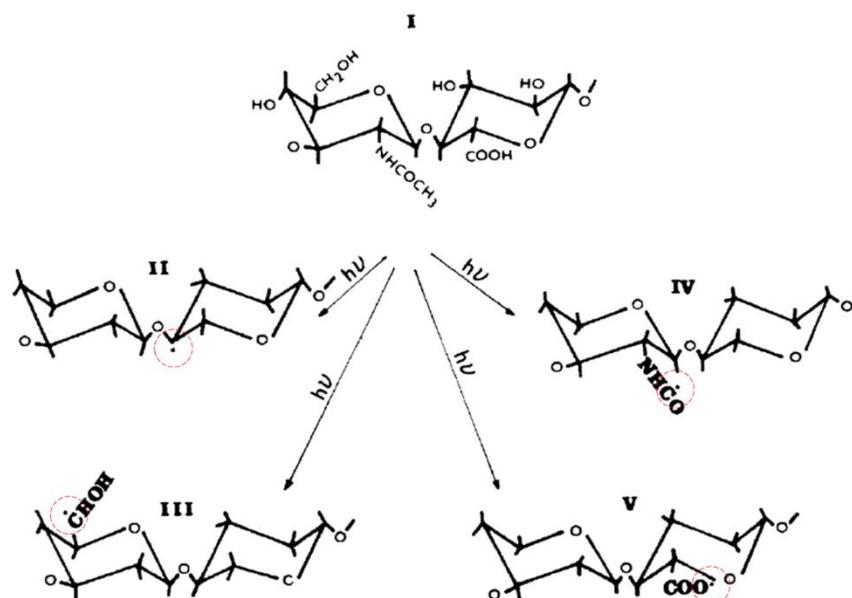


Figure 17 : Réactions photochimiques possibles après exposition UV de l'acide hyaluronique. Modifiée à partir de la référence (46)

Rayonnements gamma (γ) : En 1993, Reháková *et al.* (47) ont exposés des fragments d'AH sous forme de poudre ou de solution à des irradiations-γ avec des doses comprises entre 6 à 24 kGy (Kilogray). La **Figure 18** illustre les résultats qu'ils ont pu obtenir après une irradiation avec 6 kGy, (soit la dose minimale nécessaire pour la stérilisation de médicaments d'après l'auteur). La distribution sur le chromatogramme met en évidence une nette dégradation du polysaccharide.

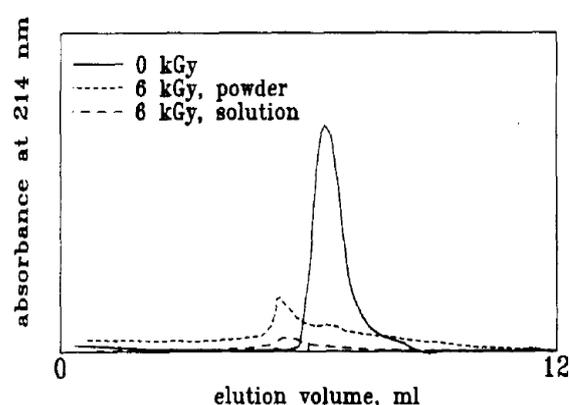


Figure 18 : Influence des rayons γ sur le chromatogramme de l'acide hyaluronique en poudre ou en solution après exposition à une dose de 6 kGy (47).

Radiations micro-ondes vs Chauffage conventionnel : En 2005, Dřimalová *E. et al.* (48) ont comparé la dégradation de solutions d'AH par chauffage conventionnel (ou « CH » pour Conventional Heating) et par radiations aux micro-ondes (**Figure 19**). Leurs travaux ont permis de mettre en évidence la dépolymérisation du polysaccharide avec ces deux méthodes sur une échelle de pH variant de 3 à 6. Cette dépolymérisation étant plus rapide à pH acide pour chaque méthode. Leur étude a permis de démontrer que la dégradation par micro-ondes est plus rapide que par chauffage conventionnel. Cela peut-être être expliqué par le mode d'action des micro-ondes qui agissent directement à l'intérieur des molécules (**Figure 20**). Cela aurait pour conséquence la polarisation des liaisons glycosidiques, augmentant ainsi leur réactivité et leur sensibilité à l'hydrolyse.

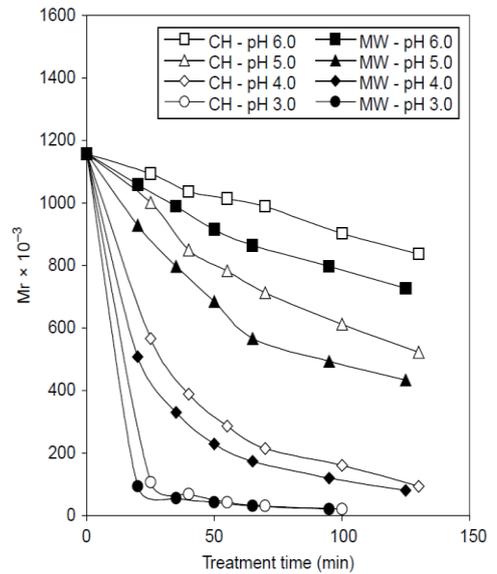


Figure 19 : Dépolymérisation de l'acide hyaluronique en solution dans l'eau (0,1% m/v) par chauffage conventionnel et par micro-ondes en fonction du pH. (L'axe en ordonnée " $M_r \times 10^{-3}$ " correspond à la masse moléculaire relative, il s'agit de la masse moléculaire divisée par 1 uma et s'exprime donc sans unités) (48).

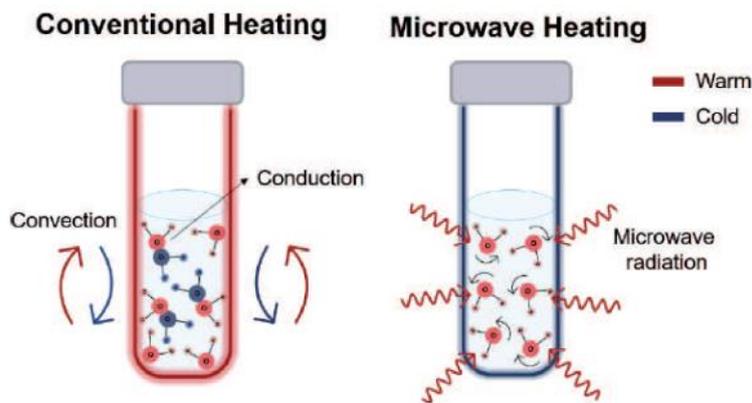


Figure 20 : Schéma des processus de chauffage conventionnel et de chauffage par micro-ondes (49).

❖ Sensibilité aux ultrasons

D'après Kubo *et al.* (50), le glycogène ou les chondroïtines sulfate (un autre type de GAG) n'ont jamais pu être dégradés par les ultrasons contrairement à l'AH étudié dans leur publication. Par comparaison aux réactions d'hydrolyse acide ou alcaline, cette dégradation n'a pas lieu via des réactions d'élimination. Ces mêmes auteurs précisent que la sonication ne permet pas de dépolymériser les fragments d'AH jusqu'au stade de monomères, peu importe la durée d'application ou l'intensité des ondes.

De nouveau par comparaison à l'hydrolyse acide ou alcaline et d'après les travaux de Vercruyse *et al.* (51), la dégradation de l'AH par sonication ne semble pas avoir lieu de manière aléatoire. Son équipe a en effet observé une même distribution bimodale (**Figure 21**) sur leur chromatogramme entre les échantillons SON-2 et SON-3.

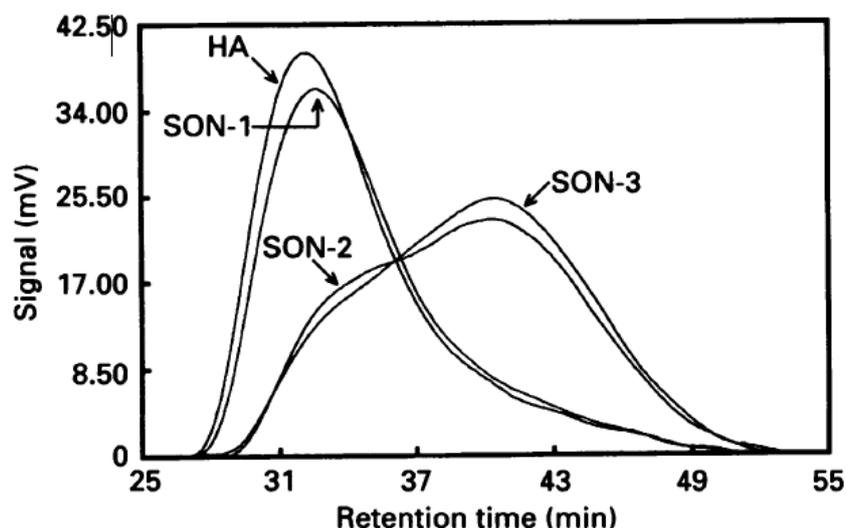


Figure 21 : Chromatogrammes de solutions d'acide hyaluronique (2,37 mg/mL) soumis aux ultrasons pendant 0 min (HA), 15 min (SON-1), 45 min (SON-2) et 60 min (SON-3) à l'aide d'un appareil de nettoyage à ultrasons de faible puissance (51).

Bien que les temps de sonication entre ces deux échantillons soient différents (45 ou 60 min), la similitude entre l'allure de leur courbe et plus particulièrement la similitude entre les temps de rétention des seconds pics montre que la dégradation de l'AH s'arrête à une certaine masse moléculaire. En effet, si l'AH continuait d'être dégradé, soit le temps de rétention du second pic de l'échantillon SON-3 serait allongé avec un signal diminué, soit un 3^{ème} pic apparaîtrait.

Cela suggère également que la dégradation d'AH de haut poids moléculaire (correspondant aux premiers pics) serait plus lente que celle d'AH bas poids moléculaire (correspondant aux seconds pics).

En complément, d'après l'étude de Dřimalová *E. et al.* (48), les auteurs expliquent que la sonication permet d'atteindre des poids moléculaires inférieurs à 100 kDa sans altérer significativement la structure chimique ou la structure primaire des macromolécules d'AH.

3 Biosynthèse et fonctions biologiques

3.1 Biosynthèse

3.1.1 Les Hyaluronic Acid Synthases : Structure et mécanisme

Chez l'homme et chez les vertébrés plus largement, la synthèse de l'AH est assurée par des glycosyltransférases (GT) connues sous le nom de Hyaluronane Synthases ou encore **Hyaluronic Acid Synthases (HAS)**. Le turnover de l'AH est plus ou moins important selon les tissus, il s'agit d'une molécule constamment renouvelée dont la synthèse est par conséquent importante. A titre d'exemples, sa demi-vie dans le sang est d'environ 3 à 5 minutes tandis que dans la peau, cette demi-vie est inférieure à 24 heures et peut atteindre 1 à 3 semaines dans le cartilage (52).

Contrairement aux autres GAG synthétisés dans l'appareil de Golgi, l'AH est produit dans la membrane plasmique des fibroblastes (entre autres) via les HAS (2,53). Il existe différentes HAS (HAS1, HAS2 et HAS3) chez les mammifères, chacune possédant deux sites de liaisons distincts pour des précurseurs UDP-activés (2). Tel que décrit précédemment, ces précurseurs correspondent à l'**UDP-GlcA** et l'**UDP-GlcNAc**. Lors de la polymérisation, ils perdent leur molécule d'UDP et forment les monomères acide glucuronique et N-acétylglucosamine de l'unité disaccharidique (**Figure 22-A**).

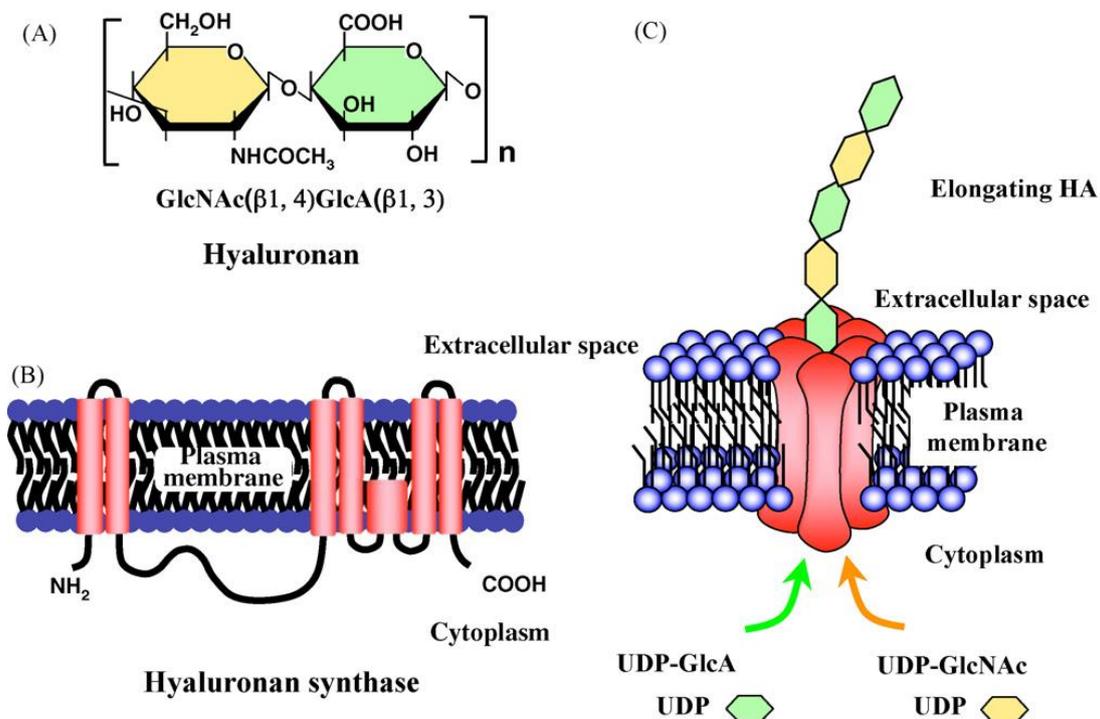


Figure 22 : Schémas de la structure d'une unité disaccharidique (A), de la structure prédictive d'une HAS de mammifère dans la membrane plasmique (B) et proposition du processus de biosynthèse d'une molécule l'acide hyaluronique par une HAS (en rouge) au travers de la membrane plasmique (C) (54).

Globalement, chez les mammifères (54) ou les bactéries (55), les HAS sont structurellement composées d'un domaine cytosolique de type GT entouré par six hélices transmembranaires, à savoir deux en N-terminale et quatre en C-terminale (**Figure 22-B**). Elles possèdent également plusieurs boucles dont une large boucle cytoplasmique sur laquelle se fixent les précurseurs (54).

La polymérisation a lieu dans le cytoplasme, à la face interne de la membrane plasmique, depuis l'extrémité **réductrice** (**Figure 23**) du polysaccharide. Cette extrémité réductrice correspond au sucre sous la forme d'un hémiacétal cyclique (**Figure 24**).

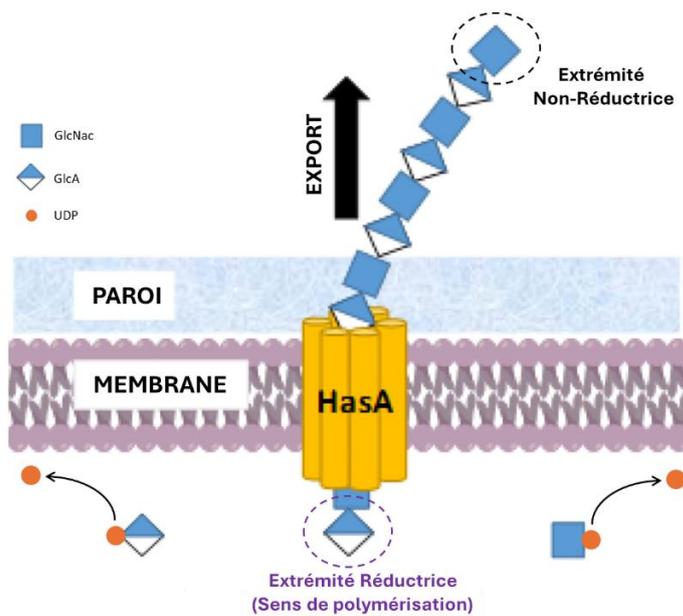


Figure 23 : Synthèse de l'acide hyaluronique chez *Streptococcus equi*. L'enzyme HasA est formée de six domaines transmembranaires impliqués dans la polymérisation et l'exportation de l'acide hyaluronique. Modifiée à partir de la référence (55).

Hémiacétal : Fonction chimique résultant de la réaction entre un aldéhyde et un alcool dont l'atome de carbone central résultant est lié à un atome d'hydrogène, une fonction alcool, un radical puis un atome d'oxygène lui-même lié à un radical. Pour un sucre sous forme linéaire, la réaction peut être intramoléculaire, il en résulte une cyclisation de ce dernier, on parle alors d'hémiacétal cyclique.

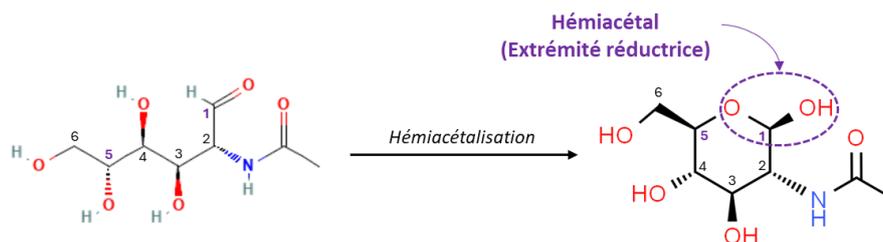


Figure 24 : Réaction d'hémiacétalisation du monomère N-Acétyleglucosamine et mise en évidence de l'extrémité réductrice correspondant au groupe Hydroxyle libre sur le Carbone C1. Par Segeron F.

Lors de la polymérisation, les précurseurs **UDP-GlcA** et **UDP-GlcNac** sont additionnés alternativement et perdent leur UDP. L'extrémité **non réductrice** est ensuite transloquée dans l'espace extracellulaire au travers du pore formé par la HAS (**Figure 22-C**). L'AH synthétisé est ensuite soit relargué dans la MEC soit retenu à la surface de la cellule pour former la matrice ou manteau péri-cellulaire (MPC) (56).

Récemment, en 2022, Maloney et al. (57) ont étudiés la HAS des Chlorovirus. Dans un premier temps, ils ont démontré que les HAS chez ces virus ont une homologie dans leur séquence d'environ 45% avec la HAS2 présente chez l'homme. De ce fait, ils ont considéré que les mécanismes découverts chez ce virus sont similaires à ceux pouvant être retrouvés chez les vertébrés. Dans un second, ils ont démontré que la polymérisation ne pouvait être initiée qu'à partir du monomère GlcNac. Ils ont également démontré qu'une étape d'hydrolyse du substrat est nécessaire pour initier la polymérisation. Cette hydrolyse a lieu uniquement lorsqu'un seul type de substrat est exposé à la HAS. La formation d'un homopolysaccharide est par conséquent impossible.

3.1.2 Rôle des différentes HAS

Initialement, les travaux de recherche visant à identifier, caractériser et connaître les mécanismes d'action des HAS bactériennes ont permis d'obtenir les bases pour l'identification des HAS chez les eucaryotes. Ainsi, chez les bactéries (tel que déjà abordé brièvement en première partie de ce chapitre), ces travaux ont permis d'identifier un opéron possédant 3 gènes (13,56):

- **hasA**, codant la HAS responsable de la polymérisation de l'AH,
- **hasB**, codant une UDP-glucose déshydrogénases (UGDH) responsable de la conversion de l'UDP-glucose en Acide UDP-Glucuronique,
- **hasC**, codant une UDP-glucose pyrophosphorylase (UGP) synthétisant l'UDP-glucose à partir de l'UTP (Uridine Triphosphate) et du Glucose-1-phosphate.

Les eucaryotes possèdent également un set d'enzyme similaire (HAS, UGDH et UGP) remplissant les mêmes fonctions nécessaires à la biosynthèse de l'AH (58–62).

Telles que citées précédemment, trois types de HAS sont retrouvées chez les mammifères. Ces enzymes ont une similarité dans leur structure d'environ 55 à 70% (2). Elles sont chacune codées par un gène spécifique (**Tableau II**).

ENZYME	GENE HUMAIN	CHROMOSOME HUMAIN	GENE MURIN	CHROMOSOME MURIN
HAS1	<i>HAS1</i>	19q13.4	<i>has1</i>	17 A3.2
HAS2	<i>HAS2</i>	8g24.12	<i>has2</i>	15 D1
HAS3	<i>HAS3</i>	16q22.1	<i>has3</i>	8 D3

Tableau II : Hyaluronan Synthases identifiées chez les humain et les souris avec leur gène associé. D'après Bastow et al. (56)

Ces enzymes possèdent des particularités qui leur sont spécifiques :

- **HAS1** est l'enzyme dont la constante de Michaelis « Km » est la plus élevée. Cela signifie que sa vitesse maximale de synthèse est atteinte pour des concentrations en substrat plus élevées que ses homologues. Par conséquent, il s'agit de l'enzyme qui synthétise le moins rapidement l'AH (2). Elle est capable de synthétiser des fragments d'AH de taille comprise entre $2 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^6$ Da (63).
- **HAS2** est capable de produire des fragments d'AH d'une taille supérieure à $2 \cdot 10^6$ Da (63). Il s'agirait d'une enzyme indispensable lors du développement embryonnaire (5). D'après *Camenisch et al.* (64,65), une délétion de son gène entraîne une formation incomplète du septum atrio-ventriculaire est devenue létale chez les souris au bout de 9,5 jours. Cette enzyme intervient en cas de stress important (hémorragie, plaie...) et lors du processus de cicatrisation (5). C'est également l'isoforme la plus exprimée dans le cartilage (56).
- **HAS3** synthétise des fragments d'AH de plus petite taille, environ $1 \cdot 10^5$ à $1 \cdot 10^6$ Da (63). Elle serait l'enzyme la plus efficace et intervient au niveau péri-cellulaire pour la synthèse de la MPC de certaines cellules (5).

Le niveau d'expression de ces isoenzymes diffère lors du processus de morphogénèse ou selon l'état pathologique d'un tissu (66). Leur contrôle est régulé de manière spatio-temporelle (2). Par exemple, chez le nouveau-né on observe une diminution de la quantité d'AH au cours du développement au niveau des cordes vocales avec un dépôt concomitant de protéines fibreuses au travers de la lamina propria (tissu conjonctif lâche situé sous les épithéliums tapissant notamment les muqueuses digestives, respiratoires et urogénitales) (67).

3.2 Fonctions biologiques

3.2.1 Les principaux récepteurs de l'acide hyaluronique : CD44 et RHAMM

❖ CD44

Le cluster de différenciation 44 (CD44) fait partie des protéines capables de fixer l'AH. Il s'agit d'une protéine multi-domaine exprimée de manière ubiquitaire par de nombreux types de cellules (leucocytes, fibroblastes, cellules épithéliales, endothéliales, kératinocytes...) à la surface de leur membrane plasmique. Le gène du CD44 contient 20 exons (**Figure 25**) subissant l'épissage alternatif (68). De ce fait, il existe de multiples isoformes dont le **CD44s** correspondant à la version « standard » du récepteur. En 2014, Dicker et al. (2) rapportent que 20 « variants » **CD44v** ont été identifiés parmi 800 isoformes possibles après estimation mathématique. La combinaison des différents exons a un impact sur l'affinité du récepteur avec l'AH mais il existe d'autres facteurs à prendre en compte tel que l'état de phosphorylation au côté interne de la membrane plasmique (68) ou le nombre de N-glycolisation présents sur les sites d'activation (69).

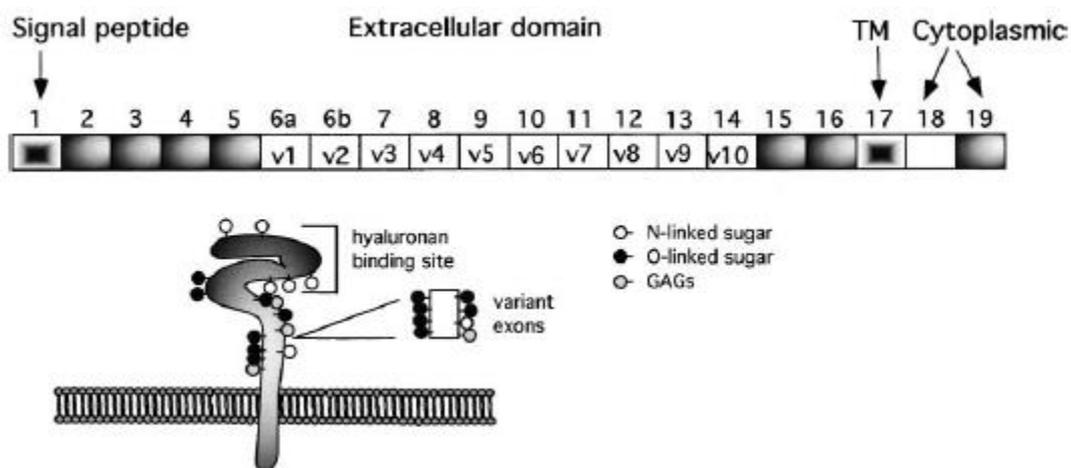


Figure 25 : Structure du récepteur CD44 et organisation génomique (68). Les cases blanches représentent les 10 exons pouvant être soit épissés pour obtenir les récepteur CD44s soit conservés selon différentes combinaisons pour obtenir les autres types de CD44v. L'exon 17 « TM » correspond au domaine transmembranaire, hautement conservé entre les différentes isoformes de CD44.

Une molécule d'AH peut se lier à plusieurs de ces récepteurs, une seule chaîne de haut poids moléculaire peut lier théoriquement jusqu'à 1000 protéines (2,70). La réponse induite par la fixation du polysaccharide sur le CD44 dépend grandement de sa taille ainsi que du phénotype cellulaire (2).

Ce récepteur est impliqué dans la motilité cellulaire incluant les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales ou encore les fibroblastes (68). Il permettrait également l'activation de lymphocytes mais peut aussi être impliqué dans des processus pathologiques comme la progression tumorale.

Par exemple, au niveau du colon, l'expression du CD44 est associée à une progression tumorale ainsi qu'à une augmentation de son potentiel métastatique (70).

Dans l'os, il joue un rôle de communication entre les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Il peut agir comme un signal « stop » de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse. Au niveau du cartilage, il participe au maintien de l'homéostasie en assurant une interaction entre les chondrocytes et la matrice extracellulaire (56).

Le CD44 est également impliqué dans la formation du MPC avec l'AH (**Figure 26**). Il s'agit d'une fine couche de 4 à 10 µm d'épaisseur présent à la surface de nombreux types de cellules comme les cellules du cumulus ophorus. Le rôle de ces cellules étant d'assurer l'intégrité et la migration de l'ovocyte qu'elles contiennent au travers de la trompe de Fallope. D'autres protéines capables de fixer l'AH sont impliquées dans la réticulation du manteau cellulaire, il peut s'agir du TSG-6 (Tumor necrosis factor-α stimulated gene 6), de la Tenascin ou encore de la Pentraxin (2).

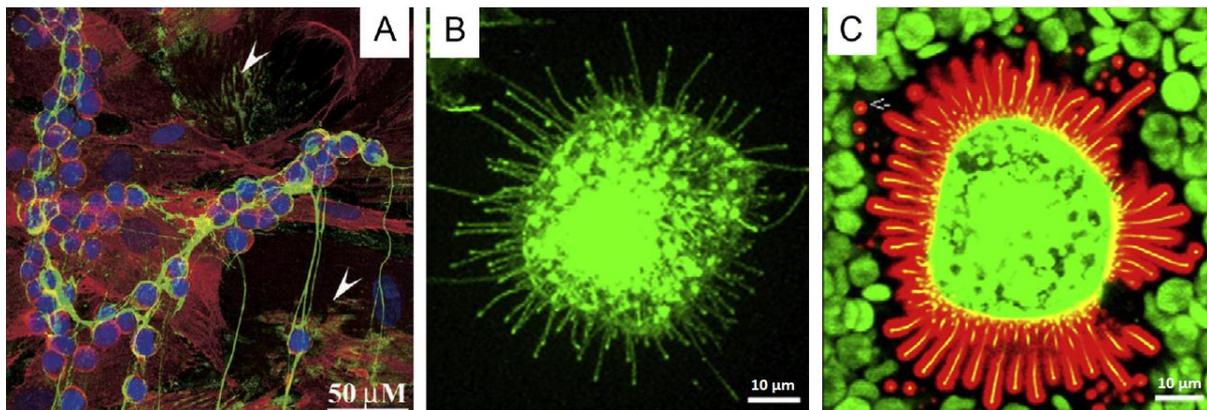


Figure 26 : Organisation de l'acide hyaluronique in vivo : A - Formation de « câbles » entre des monocytes avec en vert, l'AH ; en rouge, le CD44 et en bleu, le noyau cellulaire (71). B - MPC autour d'une cellule cancéreuse MCF-7 C avec l'AH et HAS3 en vert. C - MPC autour d'une cellule cancéreuse MCF-7 entourée de cellules hématopoïétiques en vert, de l'AH en rouge et de la protéine HAS3 en vert (72).

❖ RHAMM

Le récepteur RHAMM de l'anglais « Receptor for HA-Mediated Motility » ou encore HMMR pour « Hyaluronan-Mediated Motility Receptor » est également connu sous le nom de CD168.

Contrairement au CD44, il ne possède pas de domaine transmembranaire. Il est exprimé à l'intérieur des cellules ou leur surface sous l'influence de certains stimuli (2).

De la même façon que le CD44, ce récepteur est exprimé sous différentes isoformes après épissage alternatif et peut être retrouvé dans de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les cellules de muscles lisses des artères pulmonaires et des voies respiratoires. (52).

De la même manière que pour l'AH, sa synthèse et son expression sont initiées par une stimulation du **TGF-β1** (Tumor Growth Factor-β1), un puissant facteur de stimulation de la motilité cellulaire, permise (52).

Initialement, ce récepteur a été découvert à la **surface des cellules** et fut nommé ainsi pour sa capacité à lier l'AH et pour son implication dans la motilité cellulaire des fibroblastes. Les études menées à la suite de sa découverte ont permis de connaître son implication dans la régulation de l'inflammation, la fibrose ou encore les processus de cancérisation via son interaction avec l'AH. Plus tard, la découverte de son expression à **l'intérieur des cellules** a permis de connaître ses implications dans la régulation du cycle cellulaire lors de l'interphase, la division cellulaire (interaction avec le fuseau mitotique et le centrosome) ainsi que la transcription des gènes (73).

Dans la région extracellulaire, ce récepteur est associé au CD44 et après leur liaison avec l'AH, différentes voies de signalisation (**Figure 27**) peuvent avoir lieu (52).

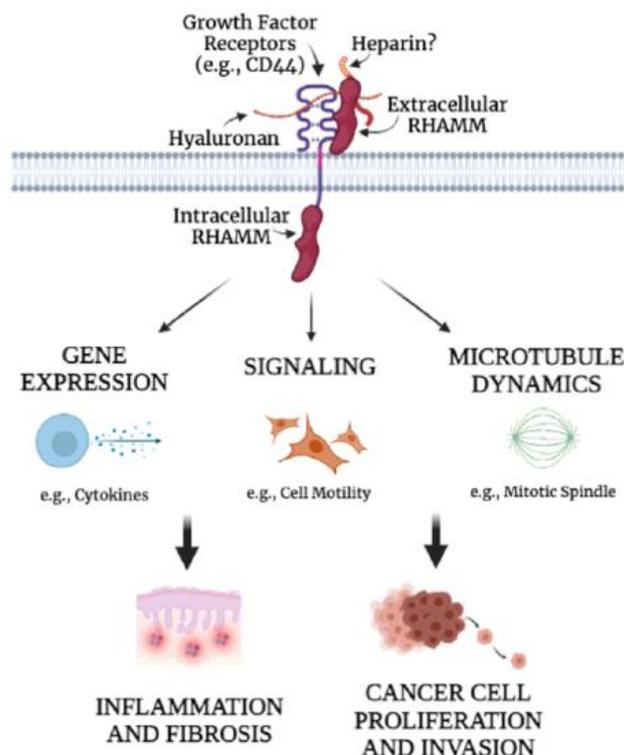


Figure 27 : Proposition de l'interaction entre le récepteur RHAMM à la surface cellulaire avec l'acide hyaluronique et l'activation de ses fonctions intra et extracellulaire (73)

De la même manière que le CD44, dans un contexte tumoral, le récepteur RHAMM peut avoir des fonctions opposées. Ces fonctions vont dépendre de nombreux facteurs tels que le type de récepteur, le type de cellule cancéreuse ou encore le micro-environnement tumoral. Un taux d'expression élevé de ce récepteur est souvent associé à un pronostic défavorable pour de nombreux types de cancers. Cependant, dans certains contextes, ce récepteur peut agir comme un suppresseur de tumeur (73).

3.2.2 Rôle structural de l'acide hyaluronique dans la MEC

Comme cité précédemment, l'AH est présent dans la MEC des tissus conjonctifs mais est aussi présent dans les tissus épithéliaux et neurologiques. Dans ces différents tissus, l'AH est capable de libérer ou retenir plusieurs éléments tels que l'eau, des ions ou encore des facteurs de croissance (5). Il permet également d'assurer des interactions cellules/cellules et cellules/MEC.

L'AH sert d'ossature pour des agrégats de protéoglycannes (**Figure 28-B**), ces derniers pouvant atteindre une longueur de 4 μm et un diamètre variant entre 500 à 600 nm. Le protéoglycane correspond à un complexe entre différents types de GAGs (Kérotane sulfate, Chondroïtine sulfate...) et un axe protéique sur lequel les GAGs viennent se fixer. Via des protéines de liaisons, les protéoglycannes sont fixés à leur tour sur le polymère d'AH. Ces différents éléments agencés entre eux se retrouvent ensuite enchevêtrés à l'intérieur de fibrilles de collagène (**Figure 28-A**).

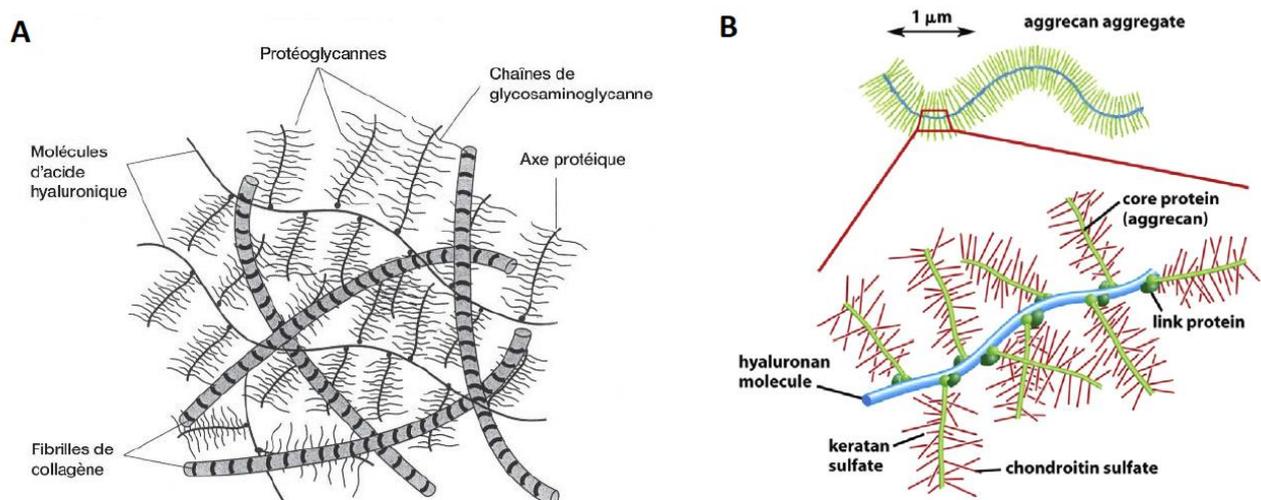


Figure 28 : A Organisation moléculaire de l'acide hyaluronique dans la MEC (5) B : Schéma de la structure entre les agrégates (protéoglycane du cartilage articulaire) et l'acide hyaluronique (2)

3.2.3 L'acide hyaluronique dans la peau

La peau (**Figure 29**) est l'organe contenant la plus grande quantité d'AH du corps humain. Dans une peau saine, l'AH est retrouvé dans l'espace intercellulaire de l'épiderme (à l'exception de la couche cornée et de la couche granuleuse supérieure) et dans le derme en quantité davantage importante (52,74).

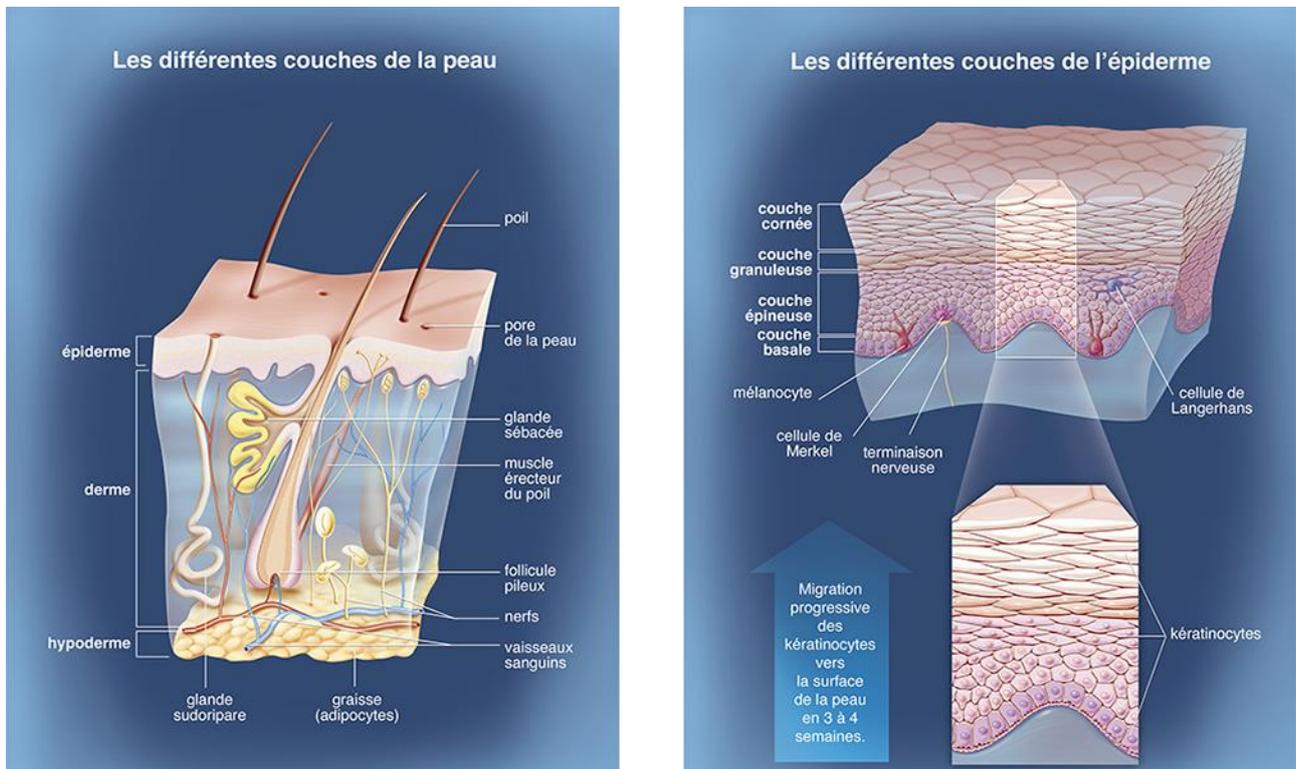


Figure 29 : Structure de la peau et de l'épiderme (75).

Hormis son rôle de matrice permettant de contenir des cellules, l'AH a de nombreuses autres fonctions dans la peau. Grâce à son importante propriété hygroscopique, l'AH peut contenir l'eau et être à l'origine de variations du volume et de l'élasticité de la peau. Il peut également être à l'origine de processus de prolifération et de différenciation cellulaire ainsi que des processus de régénération tissulaires (74).

Dans le derme et l'épiderme, les récepteurs de l'AH (CD44 et RHAMM) sont retrouvés. Dans l'épiderme, l'AH serait présent notamment dans la couche basale et épineuse et interagirait avec le CD44 pour assurer une liaison entre les cellules de Langerhans et les kératinocytes lors du processus de migration. Concernant le récepteur RHAMM, ce dernier permet de médier la locomotion des fibroblastes induite par le TGF- β . Une surexpression du récepteur RHAMM peut également jouer un rôle dans la transformation des fibroblastes (52).

Lorsque la peau vieillit, une disparition de l'AH dans l'épiderme est observée alors que ce dernier reste présent dans le derme (52). Dans le derme, la principale modification liée à l'âge est une augmentation de l'affinité de l'AH avec les autres structures (76), il existe également une réduction de la taille des fragments d'AH (77). Cette variation de l'homéostasie de l'AH dans la peau selon l'âge reste encore inexpliquée. La perte d'AH dans l'épiderme ainsi que les autres phénomènes cités ci-dessus contribuent à la perte de l'hydratation, l'atrophie et la diminution de l'élasticité de la peau (**Figure 30**).

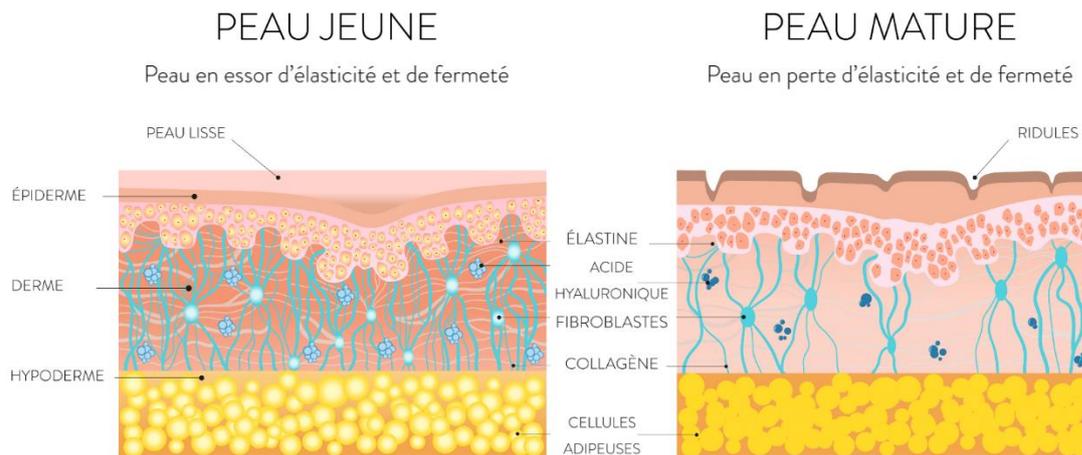


Figure 30 : Comparaison entre une peau « jeune » et une peau « mature » (78).

Il est important de noter qu'un vieillissement prématuré de la peau a lieu lors d'une exposition aux UV. Le processus de vieillissement de la peau du visage serait en partie dû aux radiations UV à hauteur de 80% (79). Les radiations UV provoquent l'apparition d'anomalies dans les concentrations des GAGs ainsi que dans leur répartition avec une diminution de l'AH et une augmentation des chondroïtines sulfate. Dans les fibroblastes du derme, la cause de la réduction de la synthèse d'AH est liée à la quantité de collagène. Ce dernier, après un processus de signalisation, provoque la diminution de l'expression du gène HAS2 (52).

Papakonstantinou *et al.* (52) expliquent qu'ils ont observé une augmentation de l'expression d'AH de poids moléculaire moins élevé dans une peau exposée aux radiations UV par rapport à une peau non irradiée. Ce phénomène serait expliqué par une diminution de l'expression de HAS1 (responsable de la synthèse de longs fragments d'AH) et d'une augmentation de l'expression des Hyaluronidases (Hyal1-3). Les auteurs ont également mis en évidence une diminution significative de l'expression des récepteurs CD44 et RAHMM dans la peau irradiée. Par ailleurs, ils ont aussi observé que la diminution de la quantité d'AH et la diminution de l'expression de HAS1 avait lieu lors du processus de vieillissement intrinsèque (sans intervention d'agents extérieurs).

3.2.4 L'acide hyaluronique dans l'os et le cartilage

❖ Acide hyaluronique et cartilage

Chez l'adulte, le cartilage est un tissu non vascularisé, non innervé et contenant peu de cellules (chondrocytes). Comme déjà vu en 1.1.2 de ce chapitre dans l'articulation synoviale, l'AH est synthétisé par des synoviocytes B de la membrane synoviale. L'AH nouvellement synthétisé à un poids moléculaire très élevé et vient se complexer avec d'autres molécules (PC, Lubricine, collagène de type II) à la surface du cartilage pour assurer sa lubrification (11). L'AH permet également d'immobiliser les agrécans via des protéines de liaison créant des liaisons indissociables. Avec l'âge, une diminution de son poids moléculaire ainsi qu'une augmentation de sa concentration sont observées et ne sont pas favorables au maintien de la lubrification (56).

❖ Acide Hyaluronique et os

Bien que des cultures à partir de fragments d'os produisent de l'AH (80,81), son rôle dans l'os reste encore inconnu et n'a pas de rôle structural ici contrairement au cartilage (56). Néanmoins, des études ont permis de montrer les effets d'un apport exogène d'AH sur le remodelage osseux et les cellules présentes dans ce tissu. Les cellules composant ce tissu sont les ostéoblastes responsables de l'ostéosynthèse, les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse et les ostéocytes correspondant à des mécano-senseurs (56) :

- Chez les **ostéoclastes**, l'AH jouerait un rôle d'inhibiteur de la résorption osseuse. Ce rôle dépendrait grandement de son poids moléculaire.
 - Pour des fragments inférieurs à 8000 Da, il deviendrait un inducteur de la résorption osseuse en interagissant avec le récepteur RANK des ostéoclastes et le RANKL (RANK-Ligand) des ostéoblastes (**Figure 31**).
 - L'AH de haut poids moléculaire aurait un effet inhibiteur de l'ostéoclastogénèse en supprimant les voies de signalisation dépendante du M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor).
- Chez les **ostéoblastes**, l'AH serait capable de moduler leur fonctionnement et d'induire l'ostéogénèse. Cette modulation dépendrait à nouveau du poids moléculaire du polysaccharide et aussi de sa concentration. L'AH de haut poids moléculaire serait un ostéoinducteur, mais cette observation reste à approfondir car d'autres GAGs sont impliqués dans l'ostéogénèse. De plus, une publication (82) montre un échec de l'induction de l'ostéogénèse par l'AH dans le contexte d'une étude sur la distraction osseuse (technique chirurgicale permettant d'allonger ou de créer de l'os).

Lors du processus du **remodelage osseux**, l'AH faciliterait l'interaction entre les ostéoblastes et les ostéoclastes pour réguler la réponse des ostéoclastes à la PTH (hormone parathyroïdienne, régulant le taux de calcium). Il influencerait le recrutement des progéniteurs d'ostéoclastes et augmenterait le taux de RANKL via le CD44 mais n'augmenterait pas le taux d'ostéoprotégérine, cela suggère que l'AH dirige la différenciation des ostéoclastes. Enfin, l'AH favoriserait la prolifération des cellules stromales et l'expression des gènes ostéogéniques indiquant un possible rôle probable dans le recrutement, la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes (56).

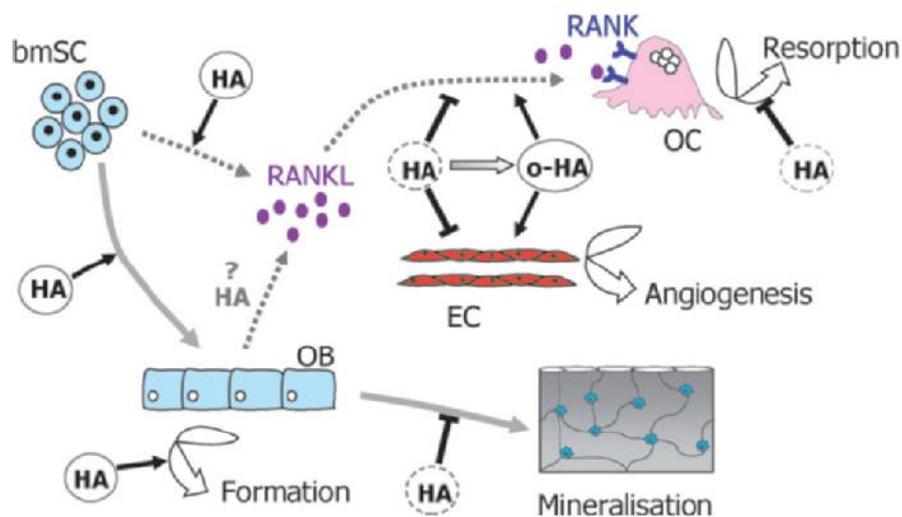


Figure 31 : Proposition des rôles de l'acide hyaluronique (AH) et ses fragments dans l'os : Modélisation schématique des rôles de l'AH dans le recrutement des ostéoblastes (OB) depuis les cellules progénitrices stromales de la moelle osseuse (bmSC) ainsi que dans la minéralisation et la formation osseuse. Rôles de l'AH intact de haut poids moléculaire (HA) et des oligosaccharides de bas poids moléculaire (o-HA) dans la médiation de la résorption osseuse par les ostéoclastes (OC) via RANK et RANKL ainsi que leur rôle dans l'angiogenèse des cellules endothéliales (EC) (56).

3.2.5 L'acide hyaluronique dans l'angiogenèse physiologique et pathologique

L'angiogenèse correspond à la néosynthèse de vaisseaux sanguins, il s'agit d'un processus physiologique. Lors de ce processus, les vaisseaux sanguins peuvent être formés à partir de structures vasculaires locales ou bien à partir de progéniteurs endothéliaux circulants, mobilisés depuis de la moelle osseuse. Ce processus est régulé par des facteurs pro-angiogéniques intervenant dans le cas d'une lésion tissulaire. Lorsque le tissu lésé est réparé et la circulation rétablie, des facteurs anti-angiogéniques vont réguler négativement ce processus.

L'équilibre entre ces différents facteurs est primordial, en cas de dérégulation, des pathologies peuvent survenir comme une hypoxie des tissus en cas d'angiogenèse insuffisante. Dans le cas contraire où l'angiogenèse serait excessive, cela peut entraîner la prolifération d'un cancer. C'est à ce niveau que la MEC entre en jeu car elle permet la diffusion des facteurs de croissance et le contrôle de la migration des cellules endothéliales. L'AH joue alors un rôle majeur en tant que molécule clef de la MEC (**Figure 32**). Ses produits de dégradation ont un réel impact sur l'angiogenèse qui est davantage prépondérant dans un contexte pathologique (83).

❖ Angiogenèse physiologique

Physiologiquement, des études rapportent que les longues chaînes d'AH jouent un rôle anti-inflammatoire (84) et anti-angiogénique (85). En se liant au récepteur CD44 des cellules endothéliales, le polysaccharide va bloquer la signalisation cellulaire conduisant la prolifération cellulaire. En opposition, les oligomères d'AH (o-AH) induisent la prolifération des cellules endothéliales en interagissant avec le CD44. Les o-AH vont d'abord initier une réponse mitotique (83,86,87) induisant ensuite l'expression des gélatinases MMP-2 et MMP-9 (Matrix Metalloproteinase) pour *in fine* permettre la formation de branchements vasculaires et la croissance des nouveaux capillaires (88,89). Ces oligomères interagissent aussi avec le récepteur RHAMM des cellules endothéliales induisant une migration cellulaire et une réorganisation du cytosquelette.

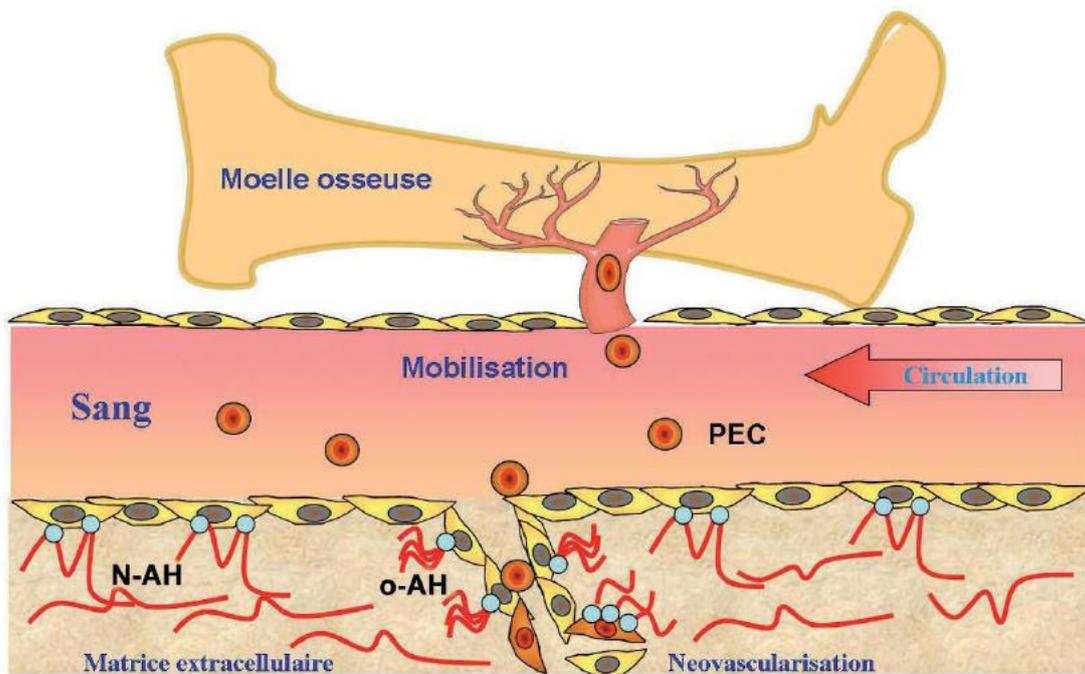


Figure 32 : Rôle de l'acide hyaluronique dans l'angiogenèse. L'angiogenèse implique des cellules endothéliales locales et des progéniteurs endothéliaux (PEC) mobilisés à partir de la moelle osseuse. Les longues chaînes d'AH (N-AH) se fixent aux cellules endothéliales et induisent leur quiescence. Dans les sites de néovascularisation, les courtes chaînes de AH (o-AH) se fixent à leurs récepteurs, qu'ils peuvent également « clustériser » (regrouper), et induisent des signaux mitotiques et migratoires (83).

❖ **Angiogenèse pathologique**

Dans un contexte pathologique, il existe une coïncidence entre l'expression des o-AH et l'angiogenèse, indiquant une relation de cause à effet entre ces deux événements. Par exemple, dans le cas d'une tumeur, les longues chaînes d'AH ont un effet sur la malignité en maintenant les cellules tumorales dans un état peu différencié et en fournissant un environnement lâche permettant la migration des cellules (90). Ces longs fragments sont rapidement hydrolysés en o-AH permettant ensuite la formation d'un réseau microvasculaire favorisant la dispersion des cellules tumorales (91). Dans un autre type de pathologie, l'athérosclérose (dépôt de plaques lipidiques contre la paroi des artères), les o-AH contribuent à l'angiogenèse intraplaque mais aussi à l'inflammation et à la prolifération des cellules à l'intérieur de la plaque athéromateuse. Une vascularisation d'une néointima se met alors en place, assurant le métabolisme des cellules et l'entretien de la plaque (92).

3.2.6 Rôles dans la cicatrisation

La cicatrisation est un processus complexe visant à restaurer un tissu par un tissu cicatriciel après avoir subi une blessure (coupure, brûlure, geste chirurgical). C'est un processus complexe qui fait entrer en jeu plusieurs facteurs tels que des cellules épidermiques (kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales...), des molécules (**AH**, protéoglycanes, fibronectine...) et des médiateurs solubles (facteur de croissance, interleukines, NO₂...). Ce processus comprend des étapes successives qui sont le saignement, l'hémostase (avec la formation d'un caillot), l'inflammation (associée à une rougeur), des phénomènes de prolifération se traduisant par un épaississement de la plaie et enfin, une phase de remodelage (5).

Physiologiquement, les longues molécules d'AH ont des propriétés anti-inflammatoire et anti-angiogéniques. Dès la fin de **l'hémostase secondaire** (formation d'un caillot de fibrine), l'AH est libéré des protéoglycanes et se retrouve alors sous forme soluble et peut être clivé en fragments par des hyaluronidases. Ces fragments vont pouvoir stimuler l'inflammation et l'angiogenèse en activant les cellules endothéliales et vont agir sur ces cellules tout au long du processus de cicatrisation. Lors de ce processus, des facteurs exogènes stimulant les défenses immunitaires sont reconnus par les récepteurs TLR (Toll-like Receptors), l'AH joue alors un rôle facilitateur de liaison entre ces facteurs et les TLR 2 et 4 (93,94). Au sein de la MEC, l'AH va également jouer un rôle au niveau de l'organisation du réseau vasculaire avec la mise en place des cellules endothéliales (95), la stabilisation des vaisseaux sanguins, la prolifération, la migration et la survie des cellules (5).

❖ Phénomènes inflammatoires

Les interactions de l'AH avec les récepteurs CD44 sont essentielles pour établir la liaison entre les leucocytes et les cellules endothéliales et permettre leur diapédèse au niveau du site de cicatrisation. Au site inflammatoire, une augmentation des HAS (HAS1 et HAS3) est observée ainsi qu'une élévation de l'expression des récepteurs CD44 et RHAMM (96). Une dépolymérisation (par les radicaux et les hyaluronidases entre autres) rapide de l'AH a également lieu induisant une augmentation du taux des o-AH. Ces oligomères se lient au CD44 des macrophages et stimulent l'expression des gènes de l'inflammation. Sur les cellules endothéliales, les fragments o-AH (**Figure 33**) vont se lier au récepteur RHAMM en plus du CD44 (97) et induire des signaux intracellulaire aboutissant à la prolifération et à la migration des cellules vers le site de cicatrisation (5,98).

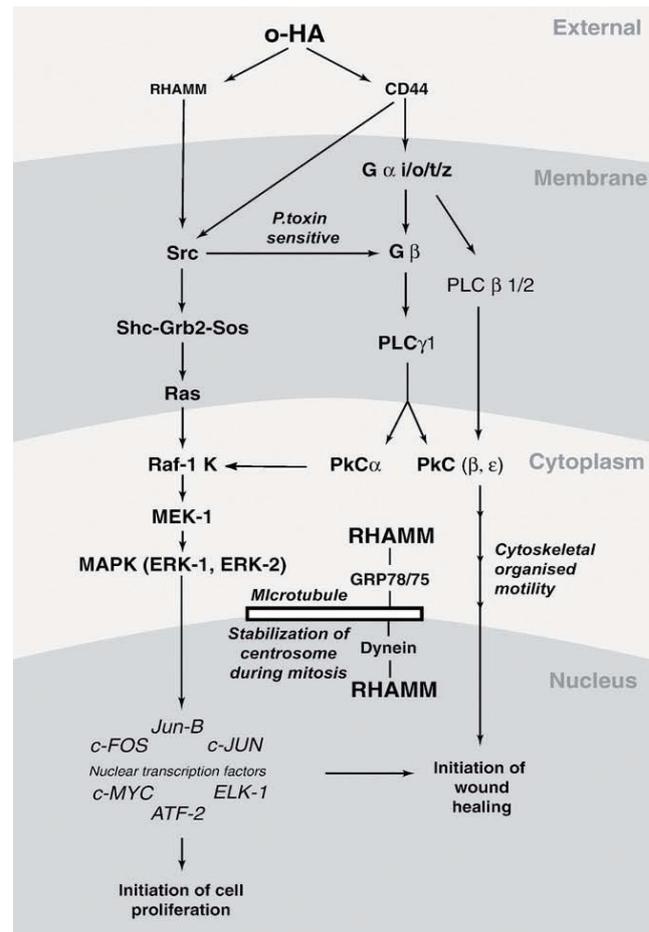


Figure 33 : Mécanismes intracellulaire des oligomères d'AH via les récepteurs cellulaires CD44 et RHAMM induisant la prolifération et la mobilisation cellulaires nécessaire à la mise en route de la cicatrisation (5,98).

❖ Angiogenèse

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'impact des oligomères dans l'angiogenèse. Ces derniers sont capables d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins de stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales ou encore de participer à la mise en place de bourgeons vasculaires (99). Comme déjà expliqué précédemment en 3.2.5, après fixation des o-AH sur les récepteurs CD44, une augmentation de la production des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 a lieu. Ces protéinases désagrègent les tissus en avant des cellules endothéliales pour permettre l'invasion cellulaire à travers la MEC et favorisent ainsi la croissance et l'invasion vasculaire (100). L'interaction des o-AH avec les récepteurs RHAMM permet quant à elle de réorganiser le cytosquelette des cellules pour favoriser la migration cellulaire (5).

❖ Impact sur la phase proliférative

Cette phase correspond à une limitation des phénomènes inflammatoires médiée par des macrophages de type M2 (101) et à une invasion du site de la plaie par des fibroblastes. Une ré-épithélialisation des berges a également lieu avec la migration des kératinocytes vers le fond de la plaie (102).

Lors de cette phase de ré-épithélialisation, il existe un accroissement de la synthèse d'AH et de ses récepteurs au niveau des kératinocytes situés sur les marges de la plaie. Au niveau du derme, l'AH favorise la motilité et la migration des fibroblastes au sein de la MEC en cours de reconstruction et favorise ensuite la prolifération de ces cellules. Les fragments d'AH permettent quant à eux de stimuler la prolifération des cellules endothéliales et de favoriser l'angiogenèse (5).

❖ Impact sur la phase de remodelage

La phase de remodelage est la plus tardive mais également la plus longue. Elle correspond au remodelage du collagène et une suppression de la vascularisation excessive. L'AH ainsi que la fibronectine et le collagène de type III sont remplacés par du collagène de type I et d'autres GAGs (chondroïtine, héparanes et dermatanes sulfates).

Concernant l'AH, durant cette phase les oligomères disparaissent progressivement laissant place à la synthèse de nouveaux polymères à chaîne longue. Ces polymères de haut poids moléculaire se lient au CD44 et interrompent la prolifération cellulaire, ils ont en plus des propriétés anti-angiogéniques en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. A la fin de cette phase, il en résulte la formation d'une cicatrice avec une hyperplasie fibroblastique, caractéristique de la cicatrisation après la naissance (103).

3.2.7 Implication dans la Réponse Immunitaire

Précédemment, les récepteurs CD44 et RHAMM ont été présentés comme étant les principaux récepteurs de l'AH. Cependant, pour comprendre l'implication du polymère dans la réponse immunitaire il est nécessaire de prendre en compte deux nouveaux types de récepteurs (104) :

- Le récepteur **LYVE-1** avec la particularité d'être présent exclusivement sur les cellules des endothéliums lymphatiques (105).
- Les récepteurs **TLR**, déjà évoqués brièvement dans les parties consacrées aux rôles de l'AH dans l'os, le cartilage et la cicatrisation. En accord avec ce qui a déjà été décrit, ces récepteurs sont principalement présents sur les cellules inflammatoires (104).

❖ Trafic cellulaire des cellules de l'immunité

De manière globale, les leucocytes et plus particulièrement, les lymphocytes sont recrutés sur le lieu de la réaction immunitaire via un phénomène de « rolling » le long des parois vasculaire (**Figure 34**). Il s'ensuit un arrêt des cellules (adhésion) laissant place à leur pénétration au sein des tissus (diapédèse et migration) (104,106).

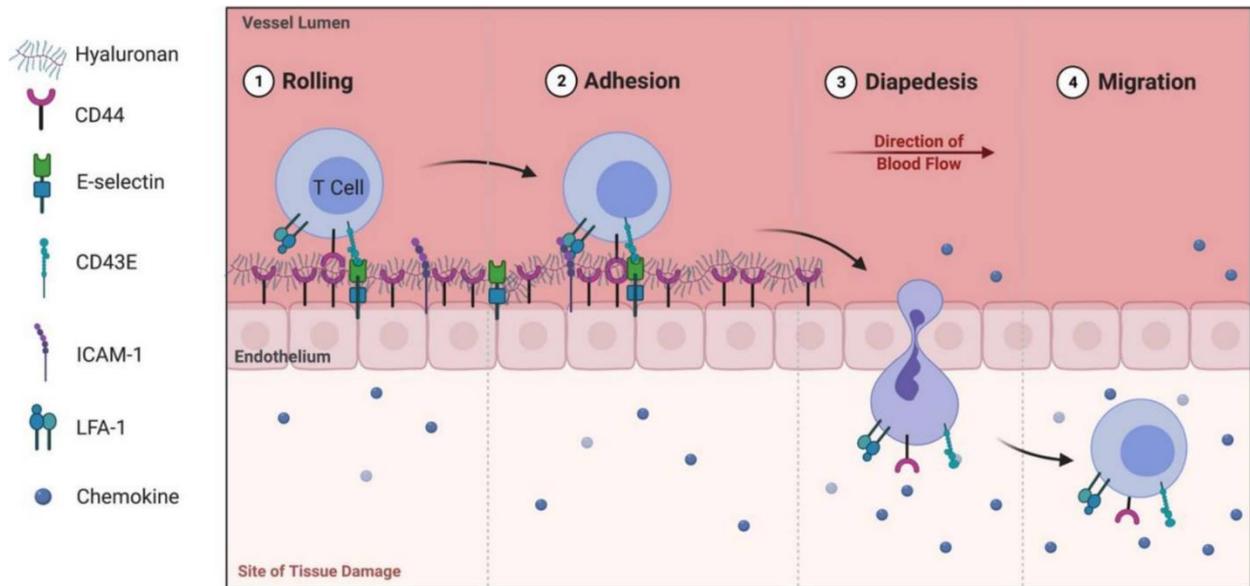


Figure 34 : Rôle de l'acide hyaluronique dans le rolling leucocytaire via son récepteur CD44 (106)

L'AH intervient dans cette phase de rolling cellulaire comme intermédiaire entre les récepteurs CD44 présents à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales en formant un pont intercellulaire (107,108). Ce pont permet ensuite une interaction avec d'autres intégrines conduisant *in fine* à l'arrêt complet des cellules le long de la paroi endothéliale (106).

Il est important de noter que l'implication de l'AH via le CD44 reste ambiguë et peut être régulée via des modifications pos-traductionnelle du CD44. En effet, dans certains modèles murins et selon le modèle, le CD44 est soit activateur soit inhibiteur de l'inflammation (104). Cette régulation entre en jeu par exemple dans la migration cellulaire des cellules dendritiques lors de leur déplacement entre le lieu de captation de l'antigène et les ganglions de drainage des vaisseaux lymphatiques.

Concernant le trafic des cellules de Langherans (cellules dendritiques) entre l'épiderme et les ganglions de drainage, leur migration est permise spécifiquement par l'interaction avec les récepteurs **LYVE-1** présents sur les cellules endothéliales lymphatiques (109).

❖ **Maturation des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes)**

L'AH pourrait exercer une influence sur la maturation des CPA en interagissant avec une isoforme particulière du CD44. Cette interaction aurait pour effet de moduler l'activité des CPA et la production de molécules co-stimulatrices à leur surface permettant ensuite l'activation des lymphocytes T (110,111).

❖ **Phénomènes inflammatoires**

Tel que déjà vu lors de la cicatrisation, l'AH interagit dans le contexte d'une inflammation via les récepteurs **TLR de type 2 et 4** sur lesquels se fixent des o-AH. Les fragments d'oligosaccharides générés par les radicaux libres (entre autres) agissent comme des signaux de danger et conduisent à une activation directe de l'allo-immunité innée (activation de lymphocytes T cytotoxiques et de macrophages) (104). Par opposition, les longues chaînes d'AH se lient au CD44 des lymphocytes T et ont pour effet d'augmenter l'expression membranaire de FoxP3 (marqueur des lymphocytes T régulateurs) et d'activer certains éléments capables de réguler négativement la signalisation dépendante des TLR. Il s'ensuit alors une production de lymphocytes T régulateur CD4+, CD25+ et FoxP3+ à l'origine de la tolérance immunitaire et de l'arrêt de l'inflammation (112).

En somme, l'implication de l'AH dans de l'inflammation est un processus finement régulé :

- Lorsqu'un tissu est lésé, le polymère est dégradé en oligomères avec un rôle d'activateurs de l'inflammation.
- Lorsque le tissu est réparé, le polymère est de nouveau synthétisé et présent sous forme de longues chaînes capables d'inhiber l'inflammation.

3.2.8 L'acide hyaluronique dans le processus de cancérisation

Dans de nombreux types de tumeurs, le microenvironnement est souvent enrichi en AH. Cela est par exemple le cas des épithéliums simples où physiologiquement l'AH est absent mais peut être retrouvé lorsque les cellules épithéliales deviennent cancéreuses. L'implication de l'AH dans la croissance et la dissémination des cellules cancéreuses d'origine épithéliales reste cependant complexe. Il favoriserait la prolifération cellulaire, empêcherait l'apoptose et assurerait le maintien de l'espace intercellulaire pour favoriser la diffusion des nutriments et augmenter la locomotion des cellules stimulant ainsi le processus d'invasion (113).

Lors du processus de cancérisation, il existe également une augmentation de l'expression de HAS et en particulier de HAS2 dans le cancer du sein, résultant d'une augmentation de la quantité d'AH dans les tissus tumoraux (114). Par ailleurs, l'inactivation du gène codant HAS2 a permis de supprimer totalement le pouvoir invasif des cellules tumorales via l'induction de l'inhibiteur de métalloprotéinase TIMP-1. HAS2 jouerait également un rôle primordial dans l'interaction entre des cellules souches cancéreuses (CSC) et les macrophages associés aux tumeurs (TAM) permettant de libérer des facteurs dérivés de croissance plaquettaires aboutissant *in fine* à l'auto-renouvellement des CSC (115).

Il est intéressant de noter qu'une augmentation modérée du taux d'AH dans le microenvironnement tumoral est corrélé à une augmentation de la croissance tumorale et à l'apparition de métastases. Cependant, lorsque ce polymère est en excès il peut devenir suppresseur de la croissance tumorale (116). En effet, il existe un équilibre régulé par les enzymes HAS et HYAL, ces dernières permettent la dégradation de la matrice riche en AH et de promouvoir la dissémination des cellules cancéreuses. Les hyaluronidases jouent donc un rôle majeur dans l'apparition de métastases en produisant des petits fragments d'AH capables de stimuler l'angiogenèse et la croissance de nouveaux capillaires tel que déjà décrit précédemment (86).

Concernant l'interaction de l'AH avec son récepteur CD44, celle-ci est associée à une modulation du comportement cellulaire lors de la croissance tumorale et à l'apparition de métastases. Dans de nombreux types de cancer, il existe une corrélation entre l'augmentation du niveau d'expression du CD44s et l'apparition de métastases (117). Cette interaction affecte l'adhésion des cellules cancéreuses et augmente l'activité d'enzymes de dégradation de la MEC. Par exemple, dans les cellules épithéliales, la liaison AH/CD44 agit comme un signal d'activation d'enzymes de dégradation de la MEC permettant aux cellules cancéreuses de se détacher de la masse tumorale et de migrer. Cette liaison augmente l'expression de MMP-9 à la surface de la membrane plasmique et augmente l'activité de HYAL2 grâce à l'ajustement du pH via un contrôle des échangeurs Na^+/H^+ (118,119). Enfin, dans plusieurs types de cancer, le CD44 est capable d'activer différentes protéines G impliquées dans le remodelage des filaments d'actine du cytosquelette eux-mêmes impliqués dans les mouvements cellulaires (120–122).

3.2.9 Pathologies pulmonaires

Dans les poumons, l'AH optimise la fonction du micro-environnement en mettant en place un gradient de viscosité, plus faible dans les alvéoles et permettant de maintenir leur perméabilité. Il peut cependant exister un déséquilibre de ce gradient, notamment chez les nourrissons prématurés avec un syndrome de détresse respiratoire où la quantité d'AH est plus élevée que la normale. Cette dérégulation peut également avoir lieu lors de lésions pulmonaires induites conduisant ensuite à la formation d'œdèmes pulmonaires (37).

L'AH peut avoir un impact indirect dans les pathologies pulmonaires. Par exemple, lors d'une pathologie inflammatoire chronique des voies respiratoires, il peut exister une hypersécrétion de mucus composé notamment de la mucine 5AC (MUC5AC) dont l'expression est régulée positivement par l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). A l'aide d'un modèle cellulaire, *Yu et al* (123) ont démontré *in vitro* que cette hypersécrétion serait liée à la dépolymérisation de l'AH par les ROS (Reactive Oxygen Species). Les fragments d'AH générés par les ROS se fixent au récepteur CD44 et induisent l'activation d'une kallibréine tissulaire capable de cliver des précurseurs EGF en facteurs actifs se liant ensuite à l'EGFR. De plus, *Yu et al.* ont également prouvé que ces fragments sont capables d'induire une interaction CD44/EGFR conduisant à l'expression de la mucine MUC5AC. Ainsi, les auteurs supposent que la découverte du rôle de l'AH et son récepteur CD44 dans ce processus de signalisation peut laisser place à l'apparition de nouvelles thérapies dans le cadre de pathologies inflammatoires chroniques des voies respiratoires associées à une hypersécrétion de mucus.

CHAPITRE II : PRODUCTION DE L'ACIDE HYALURONIQUE, APPLICATIONS EN SANTE ET REGLEMENTATIONS

Du fait de ses multiples fonctions biologiques dans le corps humain et de ses propriétés biocompatible, hydrophile et lubrifiante (entre autres), les applications dans le domaine médical de l'AH sont largement étudiées (18). L'intérêt pour cette molécule n'a cessé de croître et continue encore aujourd'hui. Un premier défi à relever réside dans sa méthode de production afin d'obtenir une molécule respectant plusieurs critères de **qualité** en vue de son utilisation pour la fabrication de médicaments, dispositifs médicaux et produits cosmétiques.

1 Voies d'obtention, modifications chimiques et contrôles qualité

1.1 Extraction animale

Historiquement, l'AH était extrait à partir de tissus d'origine animale, plus particulièrement, à partir des crêtes de coq. Le procédé de son extraction repose brièvement sur les étapes suivantes (78) :

1. Dégraissage par un solvant
2. Protéolyse par digestion enzymatique ou chimique
3. Purification par diverses techniques
4. Précipitation dans un solvant organique
5. Filtration, séchage et broyage

Bien que cette méthode de production soit de moins en moins adaptée pour une application en santé, l'AH obtenu à partir des crêtes de coq reste utilisé lors d'études comparatives (124). La teneur parfois trop importante en impuretés provenant du tissu à partir duquel le polysaccharide est extrait ne permet pas de respecter les critères de qualité, d'efficacité et de sécurité.

Le principal avantage de cette méthode réside dans la disponibilité des matières premières provenant de sous-produits de l'industrie d'abatage animal, cependant le rendement de production reste faible. Il demeure de nombreux inconvénients comme la contamination de l'AH par des protéines ou encore le risque de véhiculer des agents pathogènes liés à l'utilisation de tissus d'origine animale. Ainsi, ces inconvénients ont conduit vers l'utilisation de méthodes biotechnologiques reposant sur la fermentation de bactéries entre autres (39).

1.2 Production biotechnologique

Les procédés reposant sur l'utilisation de bactéries présentent de nombreux avantages par rapport aux procédés d'extractions à partir de tissus d'origine animale. Dans un premier temps, le rendement de production est beaucoup plus important. Ensuite, la taille du polysaccharide pouvant être obtenue est plus grande. Enfin, la qualité du polymère est améliorée et la transmission virale inter-espèce peut être évitée (39,125–127). De plus, les bactéries sont des micro-organismes facilement cultivables, leur fermentation permet d'obtenir des molécules avec un degré de pureté plus important tout en diminuant les coûts de production. Cependant, il faut noter qu'il existe un inconvénient lié à la viscosité de l'AH, ce dernier rend le milieu de culture très visqueux et limite le transfert de l'oxygène (126).

1.2.1 Exemples de procédés de synthèse avec le genre *Streptococcus*

Tel que déjà vu dans le **Chapitre I**, certains streptocoques (groupes A et C) sont capables de produire l'AH pour former une capsule leur permettant d'échapper au système immunitaire. La production d'AH par fermentation a été décrite pour la première fois en 1937 par *Kendal et al.* en utilisant des souches de streptocoques du groupe A.

Un brevet déposé en 1985 par *Bracke et al.* (128) décrit une méthode de production via une culture de *S. Pyogenes* (Groupe A) dans un milieu **anaérobique** enrichie en CO₂ et avec l'utilisation de glucose comme source de carbone. Ils ont utilisé l'acide trichloracétique pour neutraliser les bactéries après leur fermentation afin de faciliter la séparation de l'AH du microorganisme. Avec cette méthode, les inventeurs décrivent l'obtention de polymères avec un poids moléculaire moyen de 55.10³ Da compris dans un intervalle de 10.10³ à 2.10⁶ Da.

Un second brevet déposé en 1990 par *Swann et al.* (129) décrit un procédé utilisant des souches de *S. zooepidemicus* (Groupe C) dans un milieu de culture en condition **aérobique (Figure 35)**. Pour élaborer ce milieu, une concentration élevée en oxygène est apportée durant la phase initiale de croissance exponentielle jusqu'à atteindre un taux de croissance prédéterminé. Ce procédé a permis d'améliorer le rendement de production et d'obtenir des polymères avec un poids moléculaire légèrement supérieur à 2,5.10⁶ Da.

Plus tard, en 1995 *Ellwood et al.* (130) ont développé un procédé de **culture en continu** de bactéries *S. equisimilis* (groupe C) à l'aide d'un chemostat (type de bioréacteur) (**Figure 36**). Ce procédé a permis d'obtenir un meilleur rendement de production avec un polymère de poids moléculaire moyen variant de 1 à $3 \cdot 10^6$ Da.

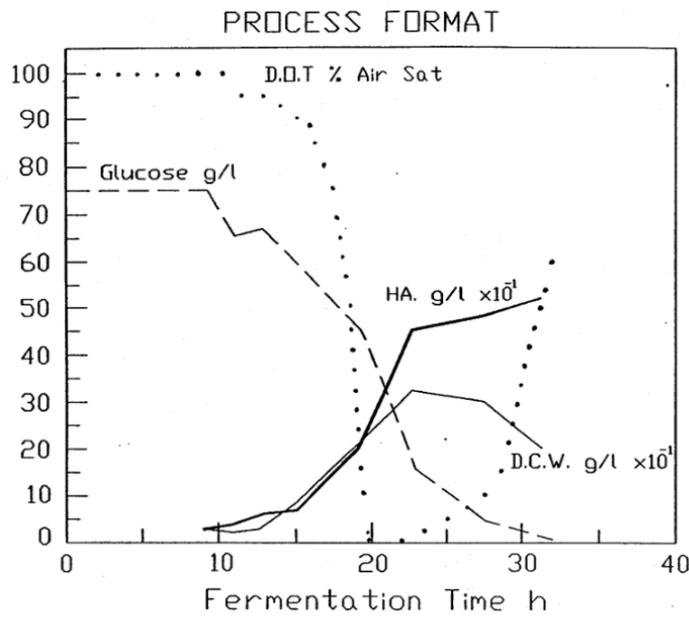


FIG. 2

Figure 35 : Description graphique du processus de production de l'acide hyaluronique par fermentation de *S. zooepidemicus* d'après le brevet déposé par Swann et al. D.O.T : Dissolved Oxygen Tension, HA : Hyaluronic Acid, D.C.W : Dry Cell Weight (129).

U.S. Patent Jan. 30, 1990 Sheet 2 of 2 4,897,349

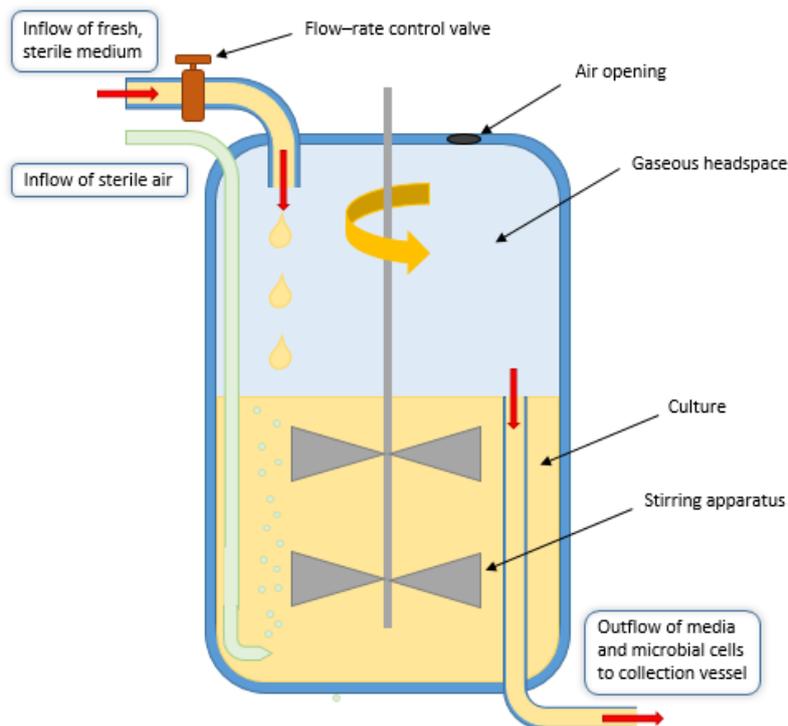


Figure 36 : Schéma d'un chemostat illustrant un mode d'alimentation continue (131).

Il est important de noter qu'un second inconvénient de la production d'AH par fermentation bactérienne est l'expression de hyaluronidase par certaines souches. Pour pallier ce problème, l'application d'agents mutagènes a permis d'obtenir des souches non-hémolytiques et négatives à la hyaluronidase (132) produisant ainsi des polymères de haut poids moléculaire (133,134).

A titre d'exemple, *Nimrod et al.* (135,136) ont utilisé un agent mutagène, la **nitrosoguanidine** sur des souches de *S. zooepidemicus*. Les souches mutantes obtenues ne montraient plus d'activité hémolytique et ont permis d'obtenir un polymère de poids moléculaire excédant $3,5 \cdot 10^6$ Da. Cette méthode aurait été la première permettant de produire de l'AH de haut poids moléculaire.

C'est ensuite en 2003 que Stahl (137) dépose son brevet sur une méthode de production permettant d'obtenir un AH de poids moléculaire pouvant dépasser les $6 \cdot 10^6$ Da. Pour y parvenir, sa méthode consiste à sélectionner des mutants *S. equi* (Groupe C) « super encapsulés » et un mode de culture limitant les turbulences à l'aide de turbines afin de préserver l'intégrité du polysaccharide

1.2.2 Synthèse par fermentation bactérienne dans des hôtes recombinants

En 1993, *DeAngelis et al.* (138) ont permis une réelle avancée scientifique en clonant et caractérisant le gène HasA correspondant à l'opéron codant pour l'enzyme de synthèse de l'AH chez les bactéries. Ce gène a pu être inséré plus tard dans différents hôtes hétérologues tel que *Bacillus subtilis* et a permis d'obtenir une réelle alternative à l'utilisation de bactéries pathogènes du genre streptococcus (139).

Bacillus subtilis présente en plus de nombreux avantages :

- Cette souche ne contient pas d'endotoxines ou exotoxines. De ce fait, les produits obtenus via *B. Subtilis* ont le statut GRAS
- Il ne produit pas de hyaluronidase
- Il fait partie des micro-organismes gram positif les mieux caractérisés
- Son génome a déjà pu être séquencé (140)

D'autres bactéries ont pu être utilisés afin d'obtenir des hôtes recombinants, il s'agit par exemple de *E. coli* (141), *Agrobacterium sp* (142) et *Lactococcus lactis* (143). Ces bactéries permettent d'obtenir un polymère avec un poids moléculaire de l'ordre de quelques millions de Da ($1,1$ à $1,2 \cdot 10^6$ pour *Bacillus subtilis* ou encore $1,3 \cdot 10^6$ avec *Corynebacterium glutamicum* (144)).

1.2.3 Synthèse chimio-enzymatique

Définition : Processus *in vitro* dans lequel des enzymes naturelles ou non sont utilisées pour effectuer une synthèse chimique organique. Cette méthode peut combiner l'utilisation de matières chimiques synthétiques et d'enzymes recombinantes naturelles.

La synthèse chimio-enzymatique de l'AH a d'abord été développée par Jing et DeAnglelis en utilisant une HAS recombinante, la pmHAS, provenant d'espèces gram négatives du genre *Pasteurella* (145). Cette enzyme a la particularité d'appartenir aux HAS de classe I, retrouvé uniquement chez le genre *Pasteurella*. Les autres types d'enzymes appartiennent à la classe II et sont présentes à la fois chez les vertébrés, les streptocoques gram positifs et les virus.

La HAS de *Pasteurella* contient dans sa région C-terminale un domaine de liaison à la membrane plasmique. Une délétion dans le gène codant pour ce domaine permet d'obtenir une enzyme cytoplasmique soluble.

Seule cette enzyme a permis *in vitro* (par comparaison aux enzymes de classe II) de réaliser des réactions d'élongation en fournissant de manière exogène, soit des oligosaccharides soit des précurseurs UDP (UDP-GlcNac et UDP-GlcA). Afin de contrôler la taille des fragments obtenus et la vitesse de réaction, les auteurs ont utilisé des molécules nommées « accepteurs » correspondant à des tétra-saccharide d'AH. Ils ont observé qu'en l'absence de ces accepteurs, la taille des polysaccharides obtenue était très variable. En jouant sur les rapports stœchiométriques accepteurs/précurseurs, la taille du polymère peut ainsi être ajustée (**Figure 37**). Avec cette méthode, les auteurs ont pu obtenir des fragments de taille comprise entre $16 \cdot 10^3$ et $2 \cdot 10^6$ Da.

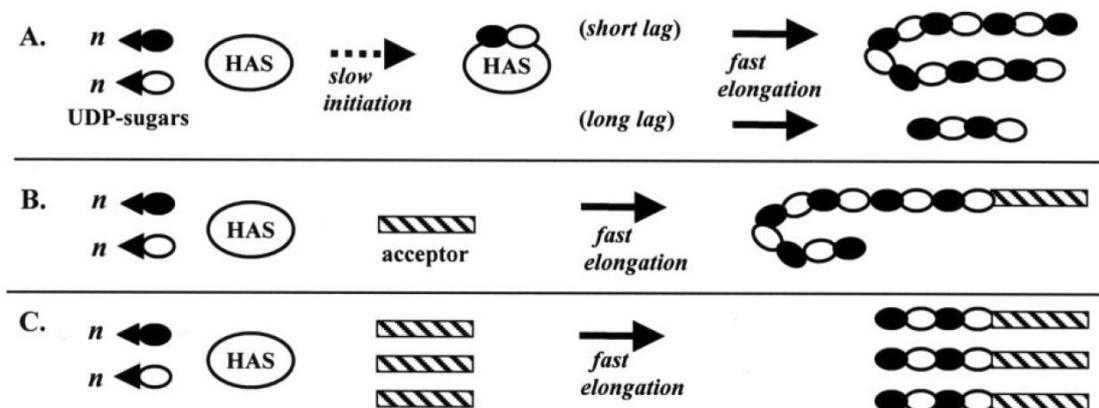


Figure 37 : Synthèse chimio enzymatique de l'acide hyaluronique. A : Absence de précurseur avec une initiation lente de la polymérisation de durée plus ou moins longue dû à la liaison des précurseurs avec l'enzyme (short lag / long lag). B : Présence d'un accepteur permettant d'éviter la phase d'initiation lente et de synchroniser la polymérisation des polysaccharides. C : Augmentation de la quantité d'accepteurs par rapport à la quantité d'enzyme permettant d'obtenir des fragments plus courts (145)

1.2.4 Purification

D'après le brevet publié en 2002 par les inventeurs Carlino S, Magnette F et Buenter R-P, l'AH peut être purifié après fermentation bactérienne de la souche *Streptococcus equi* selon la méthode suivante (146) :

- Après 20 heures de fermentation à 37 °C, le milieu de culture est récupéré puis maintenu sous agitation continue et ajusté à un pH de 2,4 avec de l'acide chlorhydrique. Cette diminution de pH a pour but de provoquer une augmentation de la viscosité (tel que déjà évoquée en 2.2.2 du chapitre 1 § Propriétés rhéologiques) et d'obtenir un bouillon très visqueux avec l'apparence d'un « pâte ».
- Le milieu filtré à l'aide d'un jeu de cartouche de filtre de 0,2µm. La vanne de filtrat est maintenue fermée afin de faire recirculer le milieu pendant plusieurs minutes jusqu'à ce que le système soit stable et qu'aucune bulle ne soit présente dans la partie retenue.
- La vanne est ensuite ouverte et de l'eau stérile exempte de pyrogènes est ajoutée de manière continue (diafiltration) selon le même débit que celui du filtrat, le volume du bouillon reste ainsi constant. La pression est également maintenue entre 1 et 3 bars.
- La diafiltration est stoppée lorsque l'absorbance du filtrat à une longueur d'onde de 280 nm atteint 0,012 OD (Densité Optique de l'anglais « Optical Density »).
- Le pH du bouillon diafiltré est ajusté à 3,5 avec de la soude puis est centrifugé à 9000 rpm à 15 °C à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérante.
- Le pH est de nouveau ajusté à 7,0 avec de la soude pour subir une filtration stérilisante au travers d'un filtre avec une taille de pores de 0,2 µm.
- Une dernière étape de lyophilisation est ensuite réalisée afin d'obtenir l'AH sous forme de poudre sèche.

Avec cette méthode, les inventeurs ont réussi à obtenir un rendement de 85 à 87 % en poids par rapport à la teneur en AH dans la solution brute. La viscosité intrinsèque (cf. 1.4.3 du présent chapitre) est de 2100 ml.g⁻¹ à 25 °C et correspond à un poids moléculaire de 1,7.10⁶ Da. Les teneurs en hyaluronate de sodium, eau, protéines, acides nucléiques et sucres neutres sont respectivement de 96,5 % ; 3,1 % ; 0,08 % ; 0,01 % et 0,01 %. Les inventeurs précisent que le hyaluronate de sodium obtenu peut être utilisé pour préparer des compositions pharmaceutiques.

1.3 Modifications chimiques et réticulation

Parmi les produits à base d'AH commercialisés par les industriels, notamment en esthétique et concernant les produits utilisés pour le comblement de rides (« fillers »), le polymère n'est pas retrouvé sous sa forme native. En effet, des modifications chimiques sont réalisées afin de moduler ses propriétés. Ces modifications ont en partie pour but de diminuer sa sensibilité à la dégradation ou bien de « customiser » son élasticité tout en conservant son caractère biocompatible et biodégradable (39).

L'agent de réticulation (ou crosslinker) le plus connu est le **BDDE (1,4-Butanediol diglycidyl ether)**. Cet agent permet la création de liaisons covalentes irréversibles. Il existe cependant de nombreux autres agents de réticulation tels que le DEO (1,2,7,8-diepoxyoctane), le DVS (Divinylsulfone), le HMDA (Hexaméthylènediamine) ou encore le PEGDE (Polyéthylèneglycoldiglycidylether) (147). Lorsqu'un produit est réticulé, sa structure chimique est modifiée selon la création de pontages moléculaires entre les disaccharides. Il est important de noter que ce pontage n'a pas toujours lieu, il se peut que l'agent réticulant ne soit lié au polymère que par une seule de ses deux extrémités (**Figure 38**), on parle alors de degré de modification, de degré de réticulation et de taux de réticulation (ou « crosslinking ratio ») :

- Le **degré de modification** correspond au ratio stœchiométrique entre la somme d'agent réticulant liée à un seul et deux saccharides par rapport au nombre d'unité disaccharidique. Il décrit la modification chimique totale du polymère et s'exprime en % : $[(A) + (B)] \div AH$
- Le **degré de réticulation** correspond au ratio stœchiométrique d'agent réticulant reliant deux saccharides (pontage moléculaire) par rapport au nombre d'unité disaccharidiques. De la même façon que le degré de modification, il est exprimé en % : $(A) \div AH$
- Le **taux de réticulation** correspond au ratio d'agents réticulant créant un pontage par rapport au nombre total d'agent réticulant lié aux saccharides : $(A) \div [(A) + (B)]$

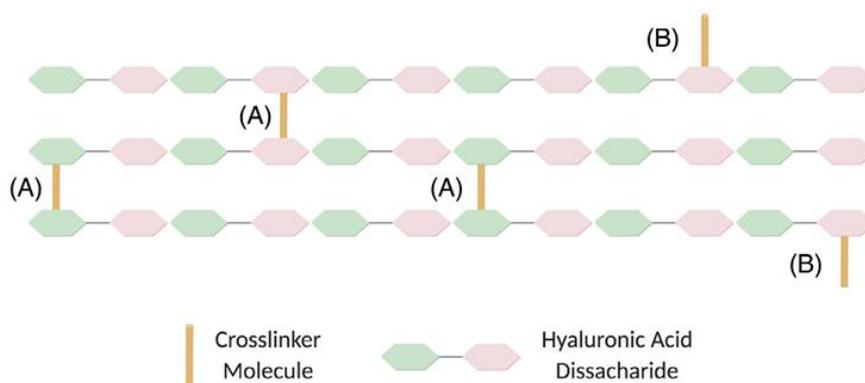


Figure 38 : Schéma d'une molécule d'acide hyaluronique réticulé par un agent réticulant (Crosslinker molecule) avec en (A) création d'un pont entre deux saccharides et en (B) l'agent réticulant lié à un seul saccharide. (148)

La réaction chimique du BDDE avec l'AH consiste en une hydrolyse à pH basique (pH > 7) dont résulte la formation d'un ether-oxyde. Sa capacité de réticulation est liée à la réactivité de ses groupements époxydes présents à ses deux extrémités. Ces groupements époxydes réagissent préférentiellement avec les alcools primaires du polysaccharide car plus facilement accessibles par rapport aux autres sites de réactions possibles (149). Comme expliqué précédemment, l'agent réticulant ne réagit pas totalement avec le polysaccharide (**Figure 39**). En effet, des molécules environnantes telle que l'eau peuvent également réagir avec les groupements époxydes.

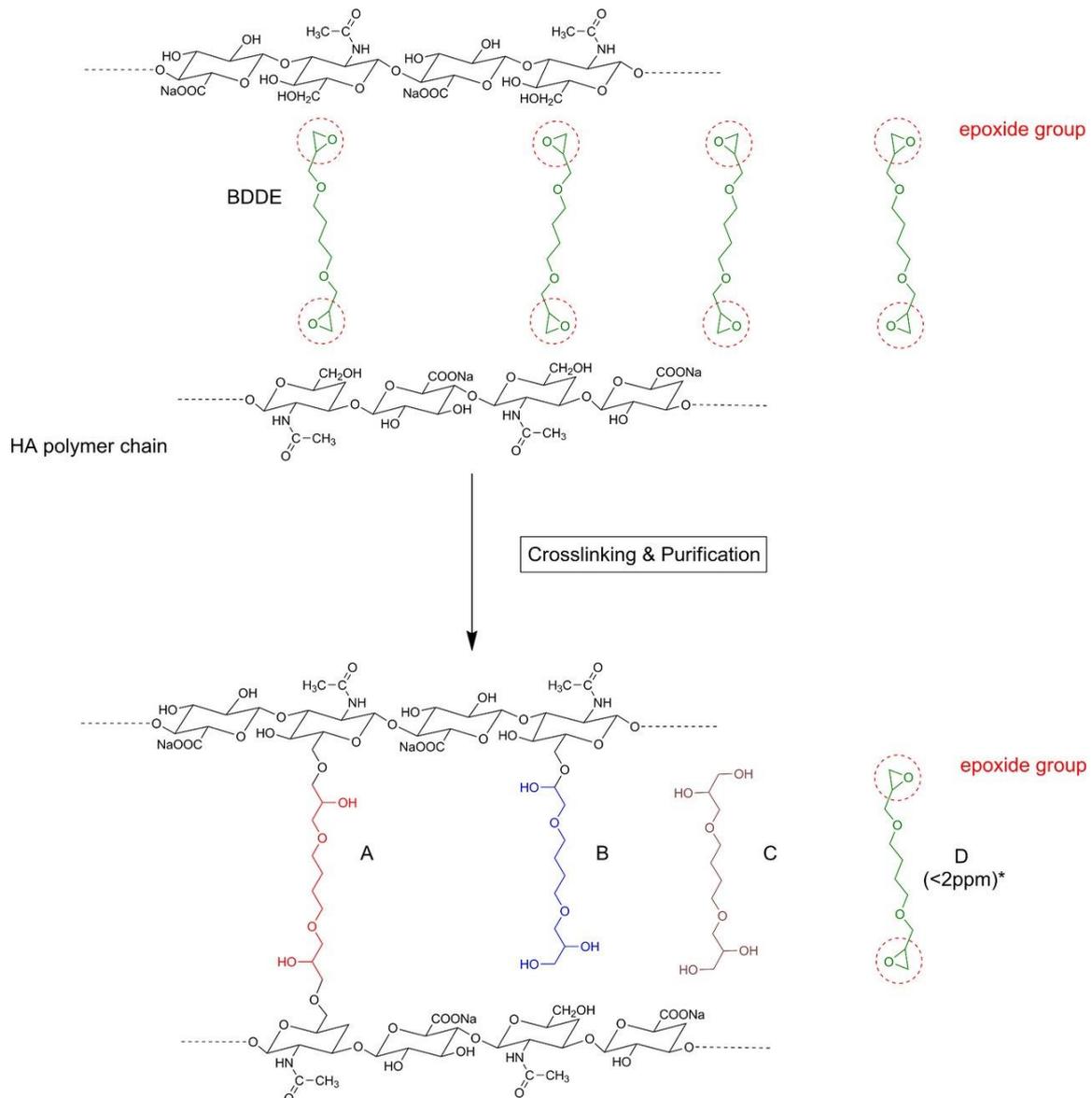


Figure 39 : Réticulation de l'acide hyaluronique(AH) par le BDDE avec les groupements époxydes entourés en rouge.
 A : BDDE ayant totalement réagit avec l'AH et création d'un pontage moléculaire – B : BDDE hydrolysé mais lié au polysaccharide à une seule de ses deux extrémités – C : BDDE hydrolysé mais non lié au polysaccharide – D : BDDE n'ayant pas réagi (149)

En termes de réglementations, la FDA (Food and Drug Administration) recommande un taux résiduel de BDDE n'ayant pas réagi (D) inférieur à 2 ppm. Cela représente moins de 2 µg de BDDE résiduel pour 2 mL de produit (147).

1.4 Contrôle qualité et standards d'analyse en industrie

1.4.1 Analyse qualitative

L'identification chimique de l'AH est réalisée par analyse infrarouge (IR) tel que décrit dans la Pharmacopée Européenne (**Annexe IV**) après comparaison avec un spectre de référence. Son spectre comprend des bandes spécifiques d'absorption situées autour de valeurs caractéristiques selon ses différents groupements (30):

- Acide carboxylique : 1736 cm^{-1} (majeure) et 1230 cm^{-1} (mineure)
- Carboxylate : 1610 cm^{-1} (majeure) et 1410 cm^{-1} (mineure)
- Amide monosubstituée : $1648, 1560$ et 1315 cm^{-1} (pics)
- Groupement méthyl associée : 1375 cm^{-1} (pic)

L'analyse infrarouge de l'AH a évolué depuis l'IR classique, avec l'analyse d'échantillons solides, vers l'utilisation de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) afin d'analyser des échantillons en solution aqueuse (150–152).

D'autres tests d'identification existent tel que l'essai au Carbazole (**Figure 40**). Il s'agit d'un test colorimétrique comprenant deux étapes (153) :

1. Une déshydratation de l'acide glucuronique dans de l'acide sulfurique (H_2SO_4) permettant la formation d'un dérivé furfural
2. Réaction du furfural avec le Carbazole permettant la formation d'un composé de couleur violet/rouge dont l'intensité peut être mesurée par spectrophotométrie.

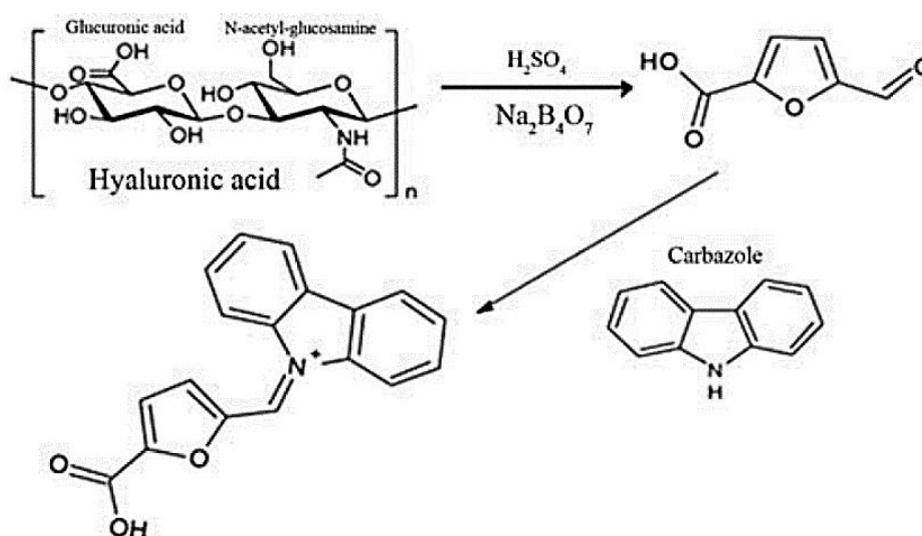


Figure 40 : Réaction d'identification au Carbazole de l'acide hyaluronique (154)

1.4.2 Analyse quantitative

La quantification de l'AH peut de nouveau être réalisée par l'essai au Carbazole tel que décrit dans la Pharmacopée Européenne. L'essai a été amélioré par Bitter et Muir (155) en ajoutant du borate dans le procédé permettant d'obtenir une meilleure coloration, plus stable dans le temps. La sensibilité avec les sels pouvant interférer est également diminuée. De plus, la reproductibilité est améliorée et l'absorbance obtenue à 530 nm est linéaire sur une plage de concentration comprise entre 4 et 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

1.4.3 Viscosité

❖ Viscosité dynamique ou viscosité absolue

Définitions :

- La **viscosité dynamique** ou **viscosité absolue** η ou μ se définit à partir de la contrainte de cisaillement qu'elle crée au sein du fluide. Elle correspond au rapport entre la **contrainte de cisaillement** qui s'applique à une couche fluide sur le **taux de cisaillement** (ou gradient de vitesse) qui existe dans ce fluide (156) (**Figure 41**). Plus simplement, la viscosité dynamique correspond à la mesure de la résistance à l'écoulement d'un fluide. Son unité dans le système internationale (SI) est le **Pascal seconde (Pa.s)**.

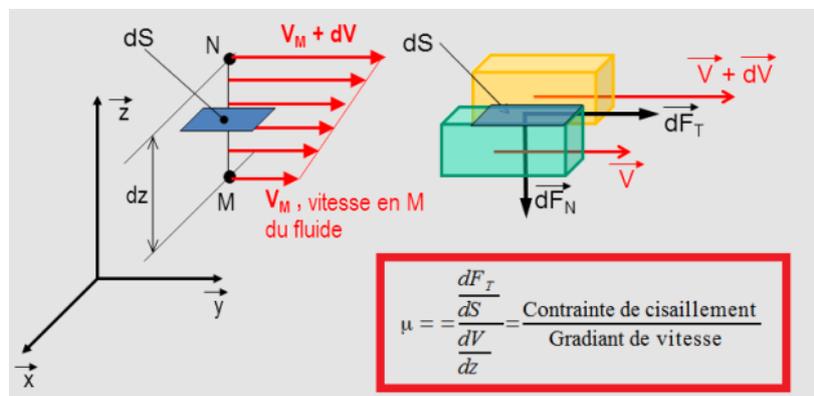


Figure 41 : représentation schématisée et formule mathématique de la viscosité dynamique avec dF_T/dS correspondant à la contrainte de cisaillement (rapport de dérivées d'une force sur une surface) et dV/dz correspondant au taux de cisaillement ou gradient de vitesse (rapport de dérivées d'une vitesse sur une distance) (156).

- La **contrainte de cisaillement** τ est une contrainte mécanique appliquée parallèlement à la section transversale d'un élément allongé, par opposition aux contraintes normales qui sont appliquées perpendiculairement (étirement ou compression) à cette surface. Cette contrainte correspond au rapport d'une force notée « F » (en newton « N ») à une surface notée « S » ou « A » (exprimée en m^2). Elle possède donc la dimension d'une pression, exprimée en **Pascal (Pa)**.

- Le **taux de cisaillement**, vitesse de cisaillement ou encore gradient de vitesse, noté « D » ou « $\dot{\gamma}$ », mesure le cisaillement appliqué au sein d'un fluide. Elle dépend de la contrainte de cisaillement et de la nature du fluide. Le gradient de vitesse décrit la variation spatiale de la vitesse d'écoulement (**Figure 42**). Son unité dans le SI est **l'inverse seconde (s^{-1})** ce qui correspond également à une **fréquence (Hz)**.

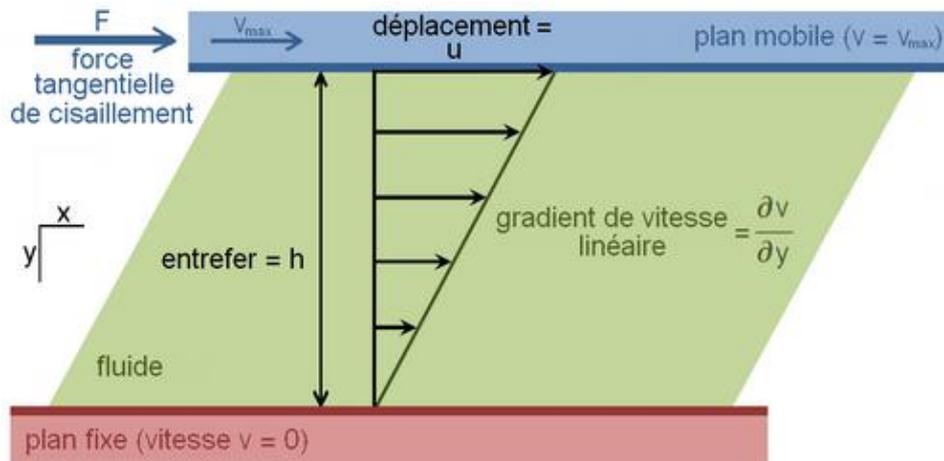


Figure 42 : Représentation schématique et formule mathématique du taux de cisaillement avec $\frac{\partial v}{\partial y}$ correspondant au rapport de dérivées partielles d'une vitesse sur une distance (157).

La mesure de cette viscosité peut s'effectuer à l'aide d'un **viscosimètre** où le produit à analyser est placé à l'interface entre deux cylindres concentriques. L'un des deux cylindres étant en rotation, la mesure du ratio des forces appliquées par unité de surface par rapport au gradient de vitesse (ou taux de cisaillement) permet d'obtenir la viscosité absolue. A titre d'information, la viscosité de l'eau est d'environ 1.10^{-3} Pa.s (soit 1 centiPoise « cP »), une solution avec une viscosité absolue de 10.10^3 Pa.s apparait « visqueuse » tandis qu'une solution avec une viscosité supérieure à 100.10^3 Pa.s est caractéristique d'un gel (158). Il est important de noter que la viscosité d'une solution d'AH peut grandement varier selon son poids moléculaire (**Figure 43**), sa concentration ou autres modifications chimiques possibles (réticulation).

❖ Viscosité cinématique

La viscosité cinématique correspond au rapport de la viscosité dynamique par la masse volumique du fluide (ou densité en se référant à la masse volumique de l'eau) et son unité dans le SI est en mètre carré par seconde ($m^2.s^{-1}$). Comme la densité des solutions d'AH est proche de 1, la viscosité dynamique et cinématique sont très proches. Cette mesure reste cependant requise par l'ISO-15798 (International Organization for Standardization) concernant l'utilisation des implants ophtalmiques (ou OVDs de l'anglais « Ophthalmic viscosurgical devices ») (30).

❖ Pseudoplasticité

Contrairement aux fluides newtoniens, la viscosité d'une solution d'AH dépend du taux de cisaillement appliqué. Pour rappel, les solutions d'AH correspondent à des fluides non-newtoniens rhéofluidifiants ou pseudoplastiques. Tel qu'expliqué précédemment, la rhéofluidification ou pseudoplasticité correspond à une diminution de la viscosité lorsque le taux de cisaillement augmente. Afin de caractériser au mieux la viscosité d'une solution d'AH, il est nécessaire de l'exprimer en fonction du taux de cisaillement. La mesure de la viscosité s'effectue alors sur une plage de taux de cisaillement (**Figure 43**) ce qui permet également de définir un domaine de linéarité pouvant varier entre différentes solutions (**Figure 44**). Pour des raisons pratiques et afin de comparer les données, les mesures de viscosité de tels fluides sont généralement fournies avec un taux de cisaillement de 1 s^{-1} (159).

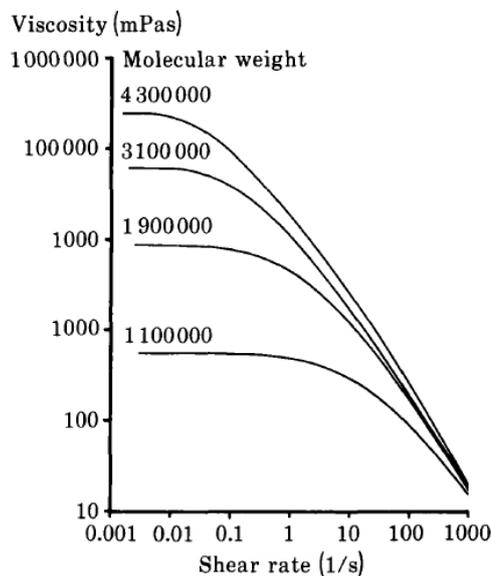


Figure 43 : Graphique de la viscosité (mPas) de différentes solutions d'acide hyaluronique de poids moléculaire différents mais de concentration identique (10 mg/mL) en fonction du taux de cisaillement (1/s) sur une échelle logarithmique (158)

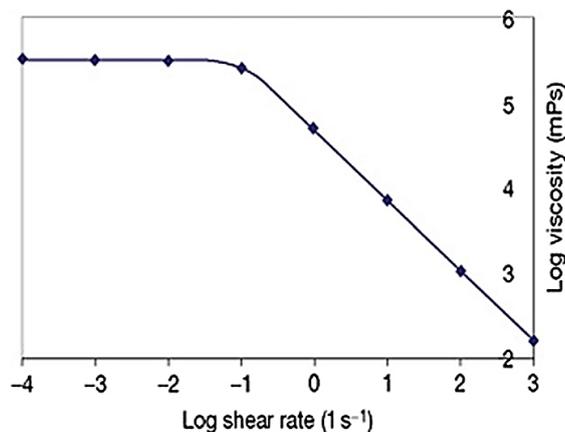


Figure 44 : Exemple de mesure de viscosité (Log viscosity) d'une solution d'acide hyaluronique en fonction du taux de cisaillement (Log shear rate) sur une échelle logarithmique illustrant un domaine linéaire (sans variation de viscosité) compris entre un log shear rate de -4 à -1 (30).

❖ Viscosité intrinsèque et masse molaire

La mesure de la viscosité intrinsèque est spécifique aux solutions de polymères. Elle s'exprime généralement en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ou $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$. Elle permet de fournir des informations sur la masse molaire moyenne viscosimétrique du polymère via l'équation de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) :

$$[\eta] = K \times \overline{M}_V^\alpha$$

Avec :

- $[\eta]$: La viscosité intrinsèque
- \overline{M}_V : La masse molaire moyenne viscosimétrique
- K et α : Constantes dépendantes de la température, de la nature du polymère et du solvant.

Ces valeurs sont obtenues à partir de tables.

Cette viscosité correspond à l'absence de toute interaction moléculaire par extrapolation à dilution infinie. Elle est directement liée à la nature des molécules du soluté. En d'autres mots, cette viscosité correspond à la lecture graphique (**Figure 45**) de la **viscosité réduite** (η_{red}) lorsque la **concentration** (C) du polymère tend vers zéro ($\lim C \rightarrow 0$). Cette viscosité réduite étant elle-même calculée à partir de la **viscosité relative** (η_R) et de la **viscosité spécifique** (η_{sp}). Pour comprendre la viscosité réduite, il faut définir d'autres types de viscosité calculées à partir de la **viscosité dynamique du solvant pur** (η_0) et de la **viscosité dynamique de la solution** (η) :

- La viscosité relative : $\eta_R = \frac{\eta}{\eta_0}$
- La viscosité spécifique : $\eta_{\text{sp}} = \eta_R - 1 = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$
- La viscosité réduite : $\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{C} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \times \frac{1}{C}$ (avec C en $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ou $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
- La viscosité intrinsèque : $[\eta] = [\eta_{\text{red}}] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{\text{red}})$

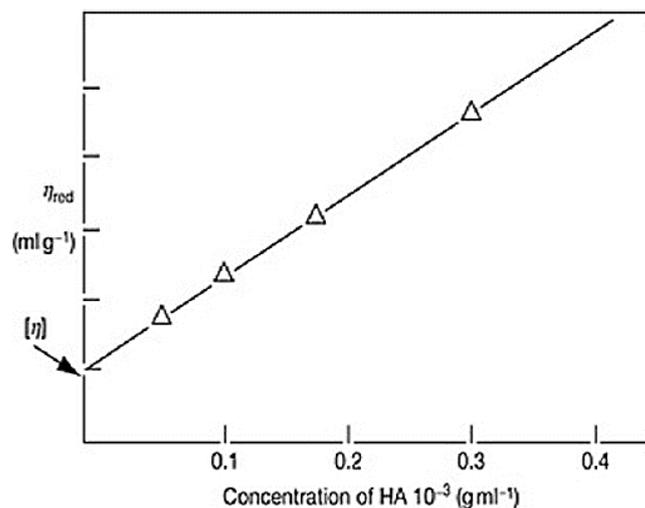


Figure 45 : Détermination graphique de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ de l'acide hyaluronique (30)

1.4.4 Elasticité

La mesure en **cisaillement** de l'élasticité va de pair avec les mesures de viscosités de solutions d'AH. Cette dualité entre élasticité et viscosité caractérise ainsi les solutions d'AH comme des solutions « viscoélastiques ». L'élasticité est une caractéristique prépondérante des produits de comblement à base d'AH utilisés en chirurgie esthétique notamment. Elle permet de refléter le caractère rigide d'un gel (30).

En rhéologie, il existe plusieurs façons de mesurer l'élasticité d'un solide (147):

- Soit en exerçant des forces de compression ou d'étirement, on parle dans ce cas de **contrainte normale** « σ »
- Soit en générant des forces de cisaillement entre deux objets (tel que décrit en 1.4.3), on parle alors de **contrainte de cisaillement** « τ »
- Ces contraintes ont la dimension d'une pression et s'expriment en Pascal (Pa)

Une contrainte est liée à la déformation du matériau. La déformation de cisaillement « γ » est modélisée par la variation du déplacement dans l'espace entre deux plans (**Figure 46**) selon la formule :

$$\gamma = \frac{u}{d}$$

Avec :

- u et d correspondent aux dimensions d'une longueur.
- γ est donc sans dimension

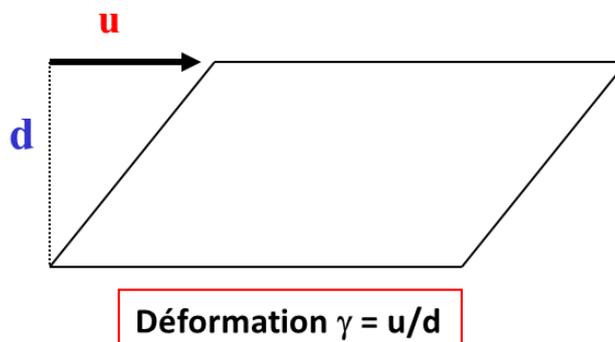


Figure 46 : Représentation schématique et formule mathématique de la déformation de cisaillement. Par Segeron F

D'après la loi de Hooke, il existe une déformation élastique qui est fonction linéaire des contraintes.

Ces contraintes et déformations sont ainsi reliées à des modules spécifiques (147) :

- Le **module de Young** ou **d'élasticité** « E » lors d'une **contrainte normale** « σ » établit la relation avec la **déformation normale** « ε » selon l'équation :

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

- Le **module de cisaillement** « G » lors d'une **contrainte de cisaillement** « τ » établit la relation avec la **déformation de cisaillement** « γ » selon l'équation :

$$G = \frac{\tau}{\gamma}$$

Bien que le module élastique « E » et le module de cisaillement « G » n'opèrent pas dans les mêmes conditions, ces valeurs sont souvent proches (160) et peuvent être reliées via l'équation suivante (161) :

$$G = \frac{E}{2(1 + \nu)}$$

Avec « ν » correspondant au coefficient de Poisson dépendant du type de matériau.

Dans le cas de fluides viscoélastique telles que les solutions d'AH, couramment nommées « hydrogels » (solubilisation d'un solide dans l'eau permettant d'obtenir un gel (147)), on utilise le **module complexe** « G^* », parfois confondu avec le module de cisaillement « G » (162). De la même manière que les modules « G » et « E », le module complexe « G^* » se définit comme étant le rapport de la **contrainte complexe** « τ^* » sur la **déformation complexe** « γ^* » :

$$G^* = \frac{\tau^*}{\gamma^*}$$

Tel que déjà décrit dans le sous chapitre 2.2.2 du Chapitre I, le module complexe comprend le **module élastique** « G' » (ou module de **conservation**). Ce **module** s'exprime en Pascals (Pa) et peut être mesuré à l'aide d'un rhéomètre (**Figure 47**). Le produit analysé est compressé entre deux surfaces, la géométrie et le plan Peltier, ce dernier permettant de contrôler la température. Le produit est ensuite soumis à des forces de cisaillement créées par la rotation d'un certain angle de la géométrie sur une plage de pulsations « ω » (rad.s^{-1}) ou de fréquences (Hz). On parle alors de sollicitation dynamique et de balayage en fréquence (dynamic/oscillatory frequency sweep).

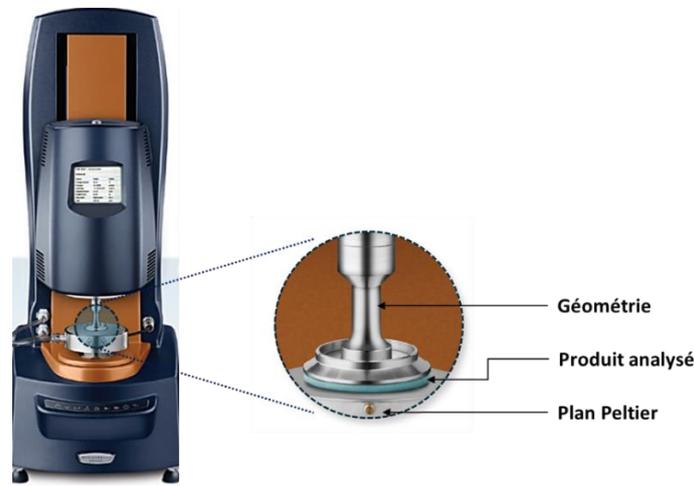


Figure 47 : Rhéomètre DHR de TA Instruments. Figure réalisée et modifiée à partir de (163)

Lors d'une mesure à fréquence donnée, la géométrie **déforme** le matériau avec un certain angle de rotation par seconde (fréquence « ω ») et une amplitude variant de façon sinusoïdale. La **contrainte** résultante est une sinusoïde de même fréquence avec un angle de déphasage « δ ». Les équations correspondantes sont alors (23) :

$$\begin{aligned}\tau(t) &= \tau_0 \cos(\omega t) \\ \gamma(t) &= \gamma_0 \cos(\omega t + \delta)\end{aligned}$$

Avec respectivement τ_0 et γ_0 les amplitudes maximales de la contrainte et de la déformation.

Pour rappel, comme le module complexe « G^* » est composé des modules G' et G'' , on obtient :

$$G^*(\omega) = \frac{\tau^*(t)}{\gamma^*(t)} = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

Le module $G'(\omega)$ représente la réponse du matériau en phase avec la contrainte (module de conservation) tandis que le module $G''(\omega)$ est la réponse différée du matériau (module de perte). Il est possible d'observer deux cas de figure (23):

- Dans le cas d'un solide élastique parfait : $G'(\omega) = G$ et $G''(\omega) = 0$
- Dans le cas d'un liquide visqueux newtonien : $G'(\omega) = 0$ et $G''(\omega) = \eta(\omega)$ (viscosité)

Un hydrogel étant un fluide non-newtonien viscoélastique, il ne correspond à aucun de ces cas de figure, les valeurs de G' et G'' sont supérieures à zéro. De manière générale, les valeurs fournies par les industriels correspondent à G' relevé à une fréquence de 1 Hz (147). Cependant, ces mesures peuvent être réalisées sur une gamme de fréquence variant de 0,01 à 100 rad.s⁻¹ (148).

1.4.5 Pureté et biocompatibilité

Comme les produits à base d'acide hyaluronique sont très souvent utilisés par voie injectable (cf. sous chapitre **2 Applications et réglementations** du présent chapitre), un certain niveau de pureté est requis. En Europe (EU) ou aux États-Unis (US), l'EMA (European Medicines Agency) ou la FDA exigent de répondre à la norme ISO 10993 (Standard – Biocompatibility Testing). Cette norme liste une série de test comme le test de maximisation sur le cochon d'Inde ou GPMT (Guinea Pig Maximization Test). Ce test consiste à évaluer la **sensibilité** au produit chez l'animal après injection intradermique ou application cutanée. Les animaux reçoivent une première dose (exposition d'induction) puis une seconde dose « déclenchante » après un certain temps de repos (période d'induction). Au cours de la période d'induction, une réaction du système immunitaire peut ou non se développer, l'application d'une seconde dose déclenche alors ou non une réaction liée à la sensibilisation du système immunitaire vis-à-vis du produit testé (164).

Afin d'évaluer le **potentiel mutagène**, le test d'Ames est indiqué (**Figure 48**). Ce test consiste par exemple à cultiver des souches *salmonella typhimurium* auxotrophes à l'histidine (c'est-à-dire nécessitant de l'histidine pour se multiplier mais incapable de synthétiser cet acide aminé). Ces bactéries sont cultivées en présence et en absence du produit à tester sur des milieux dépourvus en histidine. Si les bactéries cultivées en présence du produit potentiellement mutagène se développent en nombre supérieur par rapport aux bactéries cultivées en l'absence du produit à tester, cela prouve que la substance induit des mutations de l'opéron histidine. Il y a donc une réversion du caractère auxotrophe des bactéries vers un caractère prototrophe (c'est-à-dire capables de proliférer dans un milieu de base sans histidine). De la même manière, ce test peut être conduit avec d'autres espèces telle que *E. coli* en utilisant le tryptophane (165).

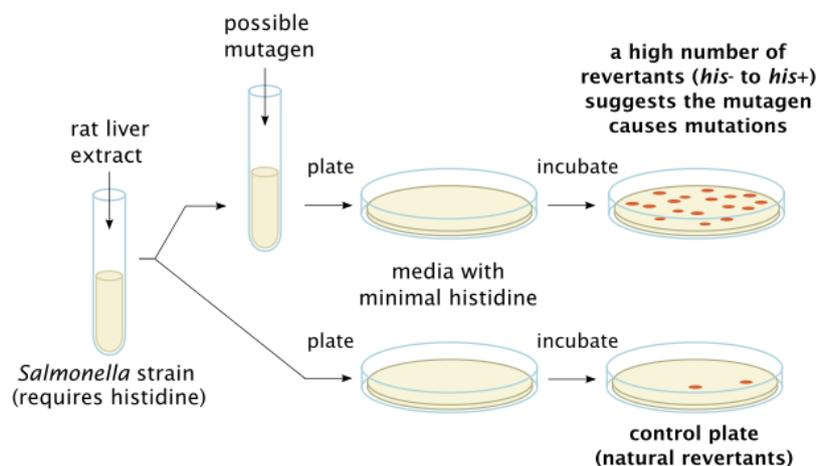


Figure 48 : Principe du test d'Ames (166)

D'autres tests évaluant la **stérilité** ou les niveaux **d'endotoxines** sont requis. Dans le cas où aucun procédé approprié d'élimination des endotoxines n'est mis en place, la pharmacopée (**Annexe IV**) exige un taux d'endotoxines :

- Inférieure à $0,5 \text{ UI.mg}^{-1}$ si le produit est injecté par voie parentérale
- Inférieure à $0,05 \text{ UI.mg}^{-1}$ dans le cas des produits injectés en intra-oculaires (produits OVD) ou intra-articulaire.

Le chapitre 2.6.14 de la pharmacopée Européenne décrit six méthodes pour quantifier ces endotoxines (167) :

- Méthode A : Gélification : essai limite
- Méthode B : Gélification : essai semi-quantitatif
- Méthode C : Turbidimétrie cinétique
- Méthode D : Colorimétrie cinétique
- Méthode E : Colorimétrie en point final
- Méthode F : Turbidimétrie en point final

Concernant la stérilité, pour des dispositifs médicaux implantables ou produits stériles, il existe différentes méthodes telles que la stérilisation par la chaleur sèche ou humide (autoclave), par l'oxyde d'éthylène (gaz) ainsi que par les radiations (rayons gamma ou faisceau d'électrons). Cependant, ces techniques et notamment les rayons gamma peuvent fortement dépolymériser le polymère. La FDA exige un niveau d'assurance stérilité ou SAL (Sterility Assurance Level) d'au moins 10^{-6} pour ces types de produits. Un SAL de 10^{-6} signifie une probabilité de survie des souches de 1 sur un million (1/1 000 000) (168). Dans le cas où le produit à base d'AH entre uniquement en contact avec une peau saine, ce SAL est alors de 10^{-3} (168). Le contrôle de la stérilité peut s'effectuer tel que décrit dans le chapitre 2.6.1 de la Pharmacopée Européenne soit par filtration sur membrane soit par ensemencement direct.

La pureté de l'AH vis-à-vis des protéines peut être contrôlé par la méthode telle que décrite dans la monographie du Hyaluronan (**Annexe IV**). Le taux de protéine ne doit pas excéder 0,1 % lorsque l'AH est destiné à la fabrication de préparations parentérales, sinon, ce taux est de 0,3 %. Concernant la pureté en acides nucléiques, cette dernière peut être contrôlée par spectrophotométrie UV où l'absorbance à 260 nm doit être inférieure à 0,5.

2 Applications et réglementations

2.1 Définitions

Avant d'aborder les différentes applications de l'AH en santé, quelques définitions préalables sont nécessaires afin de bien définir les différents champs d'application. Également, Afin d'éviter toutes confusions, une attention particulière est portée sur le fait que l'utilisation de l'AH en tant que dispositif médical de diagnostic *in vitro* (DMDIV) n'est pas traité ici. Cette partie traite uniquement de l'application de l'AH en tant que dispositif médical (DM).

2.1.1 Définition du dispositif médical

D'après le code de la santé publique art. L5211-1 (169), on entend par dispositif médical : « tout instrument, appareil, équipement, logiciel, implant, réactif, matière ou autre article, destiné par le fabricant à être utilisé, seul ou en association, chez l'homme pour l'une ou plusieurs des fins médicales mentionnées ci-après et dont l'action principale voulue dans ou sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens :

1. Diagnostic, prévention, surveillance, prédiction, pronostic, traitement ou atténuation d'une maladie ;
2. Diagnostic, contrôle, traitement, atténuation d'une blessure ou d'un handicap ou compensation de ceux-ci ;
3. Investigation, remplacement ou modification d'une structure ou fonction anatomique ou d'un processus ou état physiologique ou pathologique ;
4. Communication d'informations au moyen d'un examen *in vitro* d'échantillons provenant du corps humain, y compris les dons d'organes, de sang et de tissus ».

Afin de compléter cette définition, il est important de noter que les DM sont classés selon quatre classes dont chacune dépend d'un certain niveau de réglementation (170) :

- **Classe I** (classe de risque la plus faible) , qui comprend par exemple les lunettes correctrices, les véhicules pour personnes handicapées, les béquilles, etc. ;
- **Classe IIa** (risque potentiel modéré/mesuré) , qui comprend par exemple les lentilles de contact, les appareils d'échographie, les couronnes dentaires ;
- **Classe IIb** (risque potentiel élevé/important) , qui comprend notamment les préservatifs, les produits de désinfection des lentilles,
- **Classe III** (classe de risque la plus élevée) , qui inclut par exemple les implants mammaires, les stents, les prothèses de hanche, etc.

2.1.2 Définition du médicament

Selon la définition du code de la santé publique art. L 5111-1 (171), on entend par médicament « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que de tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue de d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».

2.1.3 Définition des produits cosmétiques

Le code de la santé publique art. 5131-1 (172) entend par produit cosmétique « toute substance ou mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles »

2.2 Exemples d'applications en santé

En lien avec ses fonctions biologiques (Chapitre I, sous chapitre 3.2) et les méthodes de réticulation possibles (Présent chapitre, sous partie 1.3), les applications de l'acide hyaluronique en santé sont très variées. Elles peuvent s'étendre du dispositif médical au produit cosmétique en passant par les médicaments. La limite concernant la classification entre médicament ou dispositif médical est parfois très fine. Cependant, les gels d'acide hyaluronique sont généralement régulés par les réglementations des dispositifs médicaux (cf. présent chapitre, sous partie 2.3).

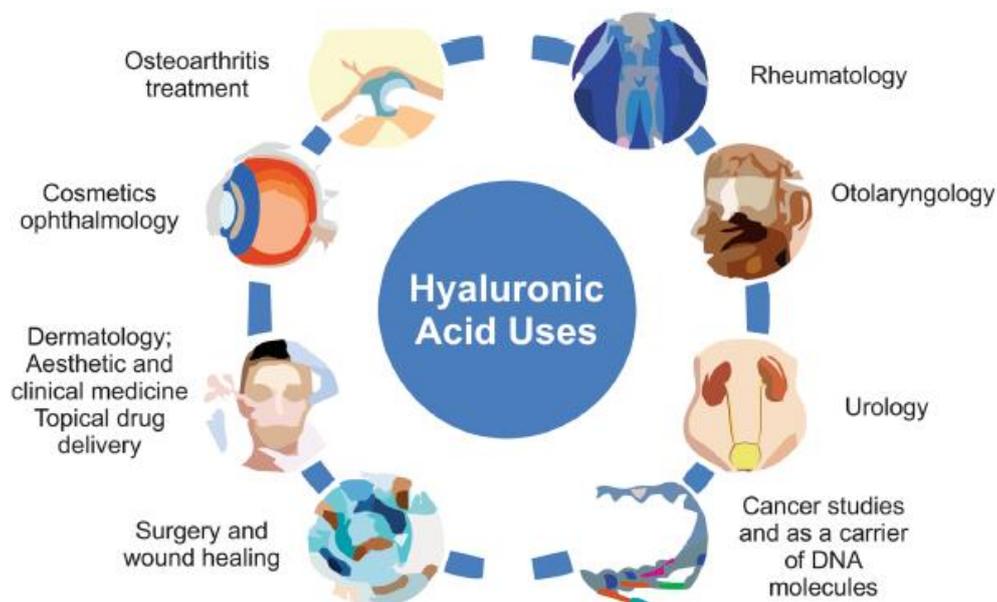


Figure 49 : Exemples d'applications biomédicales de l'acide hyaluronique (18).

2.2.1 L'acide hyaluronique en tant que dispositif médical

❖ Esthétique et visco-augmentation

Le domaine de l'esthétique constitue le principal champ d'application des gels à base d'AH en tant que « dermal filler » ou produit de comblement des rides (18). Il s'agit également du principal polymère utilisé dans ce domaine (**Annexe V**). La visco-augmentation est une technique utilisée en esthétique, elle consiste à utiliser un gel viscoélastique injectable en vue de combler les rides (**Figure 50**) ou d'augmenter le volume d'un tissu (23).

Les produits utilisés sont généralement réticulés par le BDDE, c'est par exemple le cas des produits Restylane® de Galderma, (anciennement Q-Med) (30) ou Stylage® S, M, L, XL et XXL des Laboratoires Vivacy (173). La réticulation est particulièrement intéressante pour les produits de type « dermal fillers » puisque cela permet de jouer sur leur élasticité (corrélée au module G' tel que décrit dans le présent chapitre en 1.4.4). L'élasticité est le principal paramètre à considérer pour ces types de produits, elle permet de refléter leur résistance à la déformation par les contraintes générées par les mouvements musculaires de la face et d'adapter leur fermeté selon la zone d'application.



Figure 50 : Photographies d'une patiente avant (A) et après (B) injection d'un produit Stylage (Laboratoires Vivacy) mettant en évidence une diminution du marquage des rides du sillon nasogénien (173).

❖ Ophtalmologie

Dans l'indication du traitement du syndrome de l'œil sec (sécheresse oculaire), certains collyres peuvent contenir de l'AH, c'est par exemple le cas du produit Hylo Confort®. L'AH présent dans les collyres permet de réhydrater, prolonger l'humidification de l'œil et de stabiliser le film lacrymal. Il est également intéressant de noter qu'un collyre contenant de l'AH de haut poids moléculaire aurait des propriétés anti-inflammatoires (174,175).

En chirurgie ophtalmique, des gels d'AH (non réticulés) sont utilisés en tant que dispositif d'aide à la chirurgie. Ces produits permettent par exemple (175) :

- De protéger l'endothélium cornéen de la perte de cellules en réduisant les traumatismes mécaniques en formant une couche protectrice sur l'endothélium.
- De maintenir la taille et la forme de la chambre antérieure de l'œil
- De faciliter le positionnement et la maniabilité des tissus oculaires
- De recouvrir les greffes de cornée et les implants de lentilles, réduisant ainsi le processus inflammatoire en neutralisant les charges positives sur les instruments et les implants.

A titre d'exemple, le produit I.Space® (Laboratoires Vivacy), un dispositif médical de classe IIb, fait partie des produits d'aide à la chirurgie. Il est indiqué ici pour la chirurgie du segment antérieur de l'œil (176).

❖ Ingénierie tissulaire

L'application de l'AH en ingénierie tissulaire constitue un champ de recherche dynamique. Dans la régénération tissulaire (cicatrisation) par exemple, le produit Laserskin® (**Figure 51**) correspond à une feuille d'AH réticulée par estérifications lui permettant de minimiser sa solubilité. Cette feuille, percée au laser par des pores de 40 à 500 µm, contient des kératinocytes en culture à sa surface, capables de migrer au travers des pores vers le tissu à régénérer. Des études cliniques ont été menées sur des plaies chroniques et des brûlures en comparant l'utilisation du produit Laserskin® contenant des kératinocytes seuls ou en coculture avec des fibroblastes. Ces études ont montré une meilleure régénération du tissu lorsque les cellules sont en coculture. Par la suite, ces résultats ont pu être reproduits et utilisés dans le traitement de l'ulcère de la jambe (37).

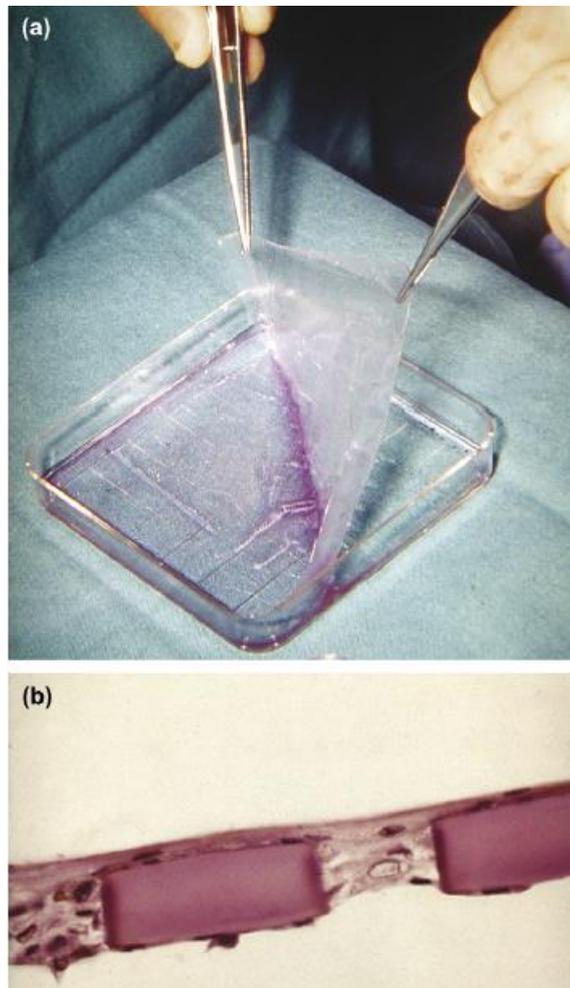


Figure 51 : Produit Laserskin® avec : (a) photographie d'une feuille du produit et (b) photomicrographie montrant la migration des kératinocytes au travers des pores (38).

❖ Rhumatologie et Viscosupplémentation

La viscosupplémentation consiste à remplacer le LS déficient en injectant un gel dans l'articulation, proche de la composition du LS (23). Des gels d'AH peuvent alors être employés dans cette indication pour traiter certaines pathologies telle que l'arthrose du genou (ou gonarthrose).

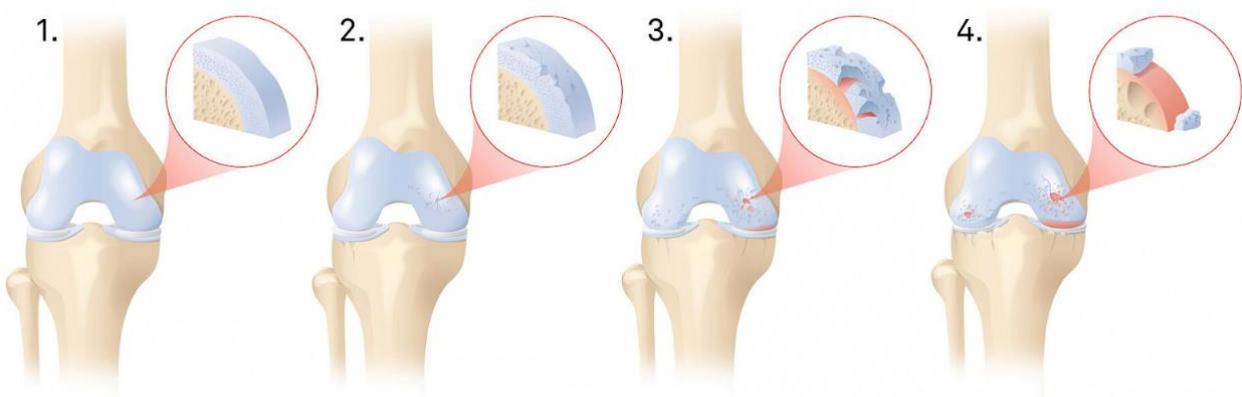


Figure 52 : Stades de lésions du cartilage dans la gonarthrose. 1. cartilage mou, 2. surface rugueuse avec fissures, 3. fissures profondes dans le cartilage allant jusqu'à l'os, 4. usure complète du cartilage avec mise à nu de l'os (177).

L'arthrose est une affection dégénérative des articulations entraînant des douleurs, des gonflements et des raideurs. Elle touche l'ensemble de l'articulation y compris les tissus qui l'entourent et apparaît le plus souvent aux genoux, aux hanches, la colonne vertébrale et les mains (178). Dans les articulations arthrosiques il a été démontré que la masse moléculaire et la concentration de l'AH étaient diminuées (179). L'injection d'AH hyaluronique synthétique pourrait donc rétablir cette concentration en utilisant un polymère de poids moléculaire correspondant à celui présent dans l'articulation saine.

D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la plupart des lignes directrices laissent entendre que la viscosupplémentation n'est pas efficace dans l'arthrose (178). Les injections de gels d'AH restent cependant indiquées en cas d'échec des autres thérapies disponibles (180). Des études montrent une efficacité de ces injections (181), parfois équivalentes aux traitements par corticoïdes (182). Le « Handbook of Pharmaceuticals Excipients » cite également une publication prouvant l'efficacité de l'AH dans le traitement de la douleur de l'arthrose (183).

Parmi les traitements proposés, il existe par exemple :

- **Synvisc-one®** de Sanofi Genzyme, indiqué comme agent de remplacement et supplément temporaire du liquide synovial. Ce produit contient les polymères hylane A et hylane B (dérivés du hyaluronane) produits à partir d'un extrait aviaire hautement purifié (184).
- **Kartilage® et Kartilage® cross** des laboratoires Vivacy, indiqués dans le traitement de la douleur liée à l'arthrose articulaire du genou (176). Ce produit contient de l'AH obtenu par biofermentation.

2.2.2 L'acide hyaluronique dans les médicaments

❖ **Viscothérapie**

La limite entre dispositif médical et médicament est parfois très fine. C'est par exemple le cas du produit Hyalgan® des laboratoires Expanscience qui est la seule solution d'AH à disposer du statut de médicament indiquée dans la prise en charge de la gonarthrose douloureuse avec épanchement. Les autres solutions d'AH ont le statut de dispositif médical (185). Ce médicament dispose d'une AMM depuis 1992 (186,187). De façon anecdotique, la HAS (Haute Autorité de Santé) indique en 2004 un service médical rendu (SMR) important avec un taux de remboursement fixé à 65% (188). En 2014, le SMR devient faible et le taux de remboursement est de 15% (186). Ce médicament n'est maintenant plus remboursé depuis décembre 2017 (185).

❖ Systèmes de délivrance de médicament et d'ADN

Le terme système de délivrance de médicament (SDM) vient de l'anglais drug delivery system (DDS), le terme exact devrait donc être plutôt système de délivrance de substance active. De ce fait, le sigle anglo-saxon DDS sera utilisé à la place de SDM afin d'être plus exact. Ce type de système peut consister en la formulation de médicaments. Par définition, toute forme ou tout dispositif médical visant à améliorer le ratio bénéfice/risque d'un médicament grâce à la maîtrise de la vitesse, du moment ou du site de libération, dans l'organisme, de la substance pharmacologiquement active sont considérés comme des DDS (189). Ainsi, un médicament ou dispositif médical sont étroitement liés dans ce contexte.

En 2004, Philip Dehayza et Cheng Lu publient un brevet (190) décrivant une méthode de fabrication de microsphères à base d'AH modifié par réticulation. Les inventeurs indiquent que ces microsphères peuvent être utilisées comme des DDS, capables de contenir des substances actives. L'un des avantages de l'utilisation d'un tel DDS est la protection de la substance active vis-à-vis de sa dégradation et de rendre ainsi sa biodisponibilité plus importante. Une libération contrôlée est également permise en retardant ou en ralentissant ou encore en maintenant cette libération dans le temps. Les inventeurs précisent également que l'avantage de l'utilisation de l'AH ici est lié à sa nature biodégradable et biocompatible et non-immunogénique, permettant son utilisation dans le corps humain.

L'AH prend alors une place non négligeable dans la formulation de nouvelles formes pharmaceutiques capables de délivrer soit une substance active, soit de l'ADN. L'équipe de chercheur *Segura T. et al* (191) ont par exemple réussi à formuler un tel système composé d'AH et de collagène. Dans ce système, correspondant à un hydrogel, l'AH est réticulé par le PEGDE et contient un gène sous forme de plasmide. Leur étude a permis de démontrer la délivrance contrôlée du gène pouvant ensuite être transfecté à l'intérieur de cellules. Les auteurs supposent ainsi un certain potentiel de leur système en ingénierie tissulaire, permettant une alternative à l'utilisation de vecteurs viraux.

D'autres applications de l'AH réticulé comme DDS ont été étudiées en 2018 par Gangliang Huang et Hualiang Huang (192). Dans leur article, les auteurs soulignent une application en oncologie. En lien avec les fonctions biologiques étudiées précédemment (Chapitre I), les auteurs précisent que l'AH est particulièrement intéressant en oncologie car il est capable de se fixer spécifiquement au CD44, surexprimé dans de nombreux types de cellules cancéreuses.

Les recherches autour de la formulation de DDS utilisant l'AH continuent d'être explorées dans de nombreux domaines (193). Différentes techniques de formulation peuvent être combinées comme la réticulation d'hydrogels et la formulation d'émulsions afin de véhiculer des drogues lipophiles ou hydrophiles (**Figure 53**).

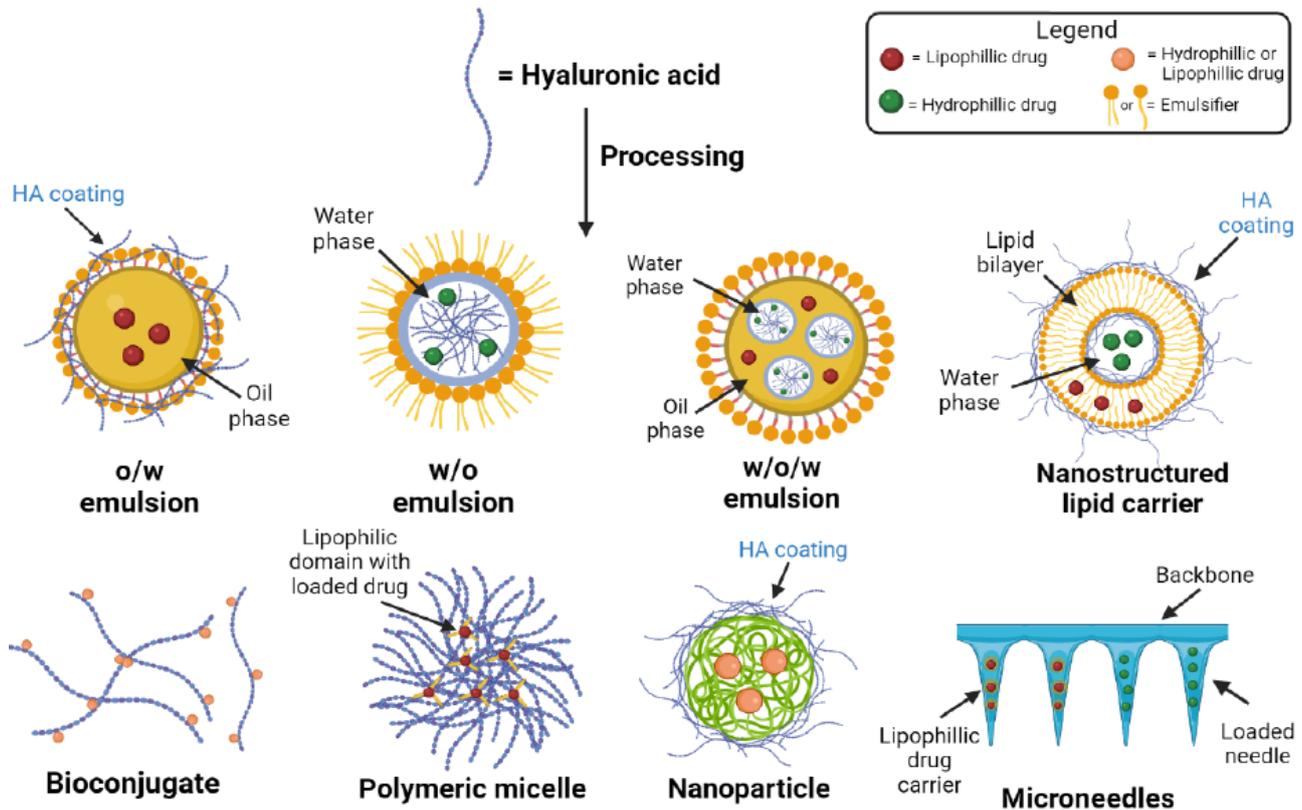


Figure 53 : Exemples de formulations de systèmes de délivrance de médicament à base d'acide hyaluronique (w = water/phase hydrophile), o = oil/phase lipophile) (193)

2.2.3 Acide hyaluronique et cosmétiques

L'AH est l'une des substances les plus utilisées dans la formulation de produits cosmétiques. Cependant, ses mécanismes de pénétration à travers la peau demeurent mal connus (194).

❖ Soins cutanés

Dans les soins cutanés, l'AH peut être utilisé comme agent hydratant. Des lotions, crèmes ou sérums contenant ce polymère permettraient d'humidifier la peau et d'améliorer son élasticité, diminuant par conséquent la profondeur des rides (194). Son efficacité dans la protection contre les rayons UV a également pu être prouvée, en lien avec son potentiel anti-oxydant (195).

Concernant les mécanismes d'hydratation, un polymère de haut poids moléculaire forme un film viscoélastique à la surface de la peau et présenterait ainsi un effet occlusif empêchant l'eau de s'évaporer. Un polymère de bas poids moléculaire serait capable d'hydrater directement la peau, d'avoir des propriétés régénératrices et de renforcer les jonctions serrées entre les cellules. Globalement, la propriété hygroscopique des polymères de haut poids, de bas poids ou de poids intermédiaire permettrait de justifier leur capacité à maintenir l'hydratation de la peau (195,196).

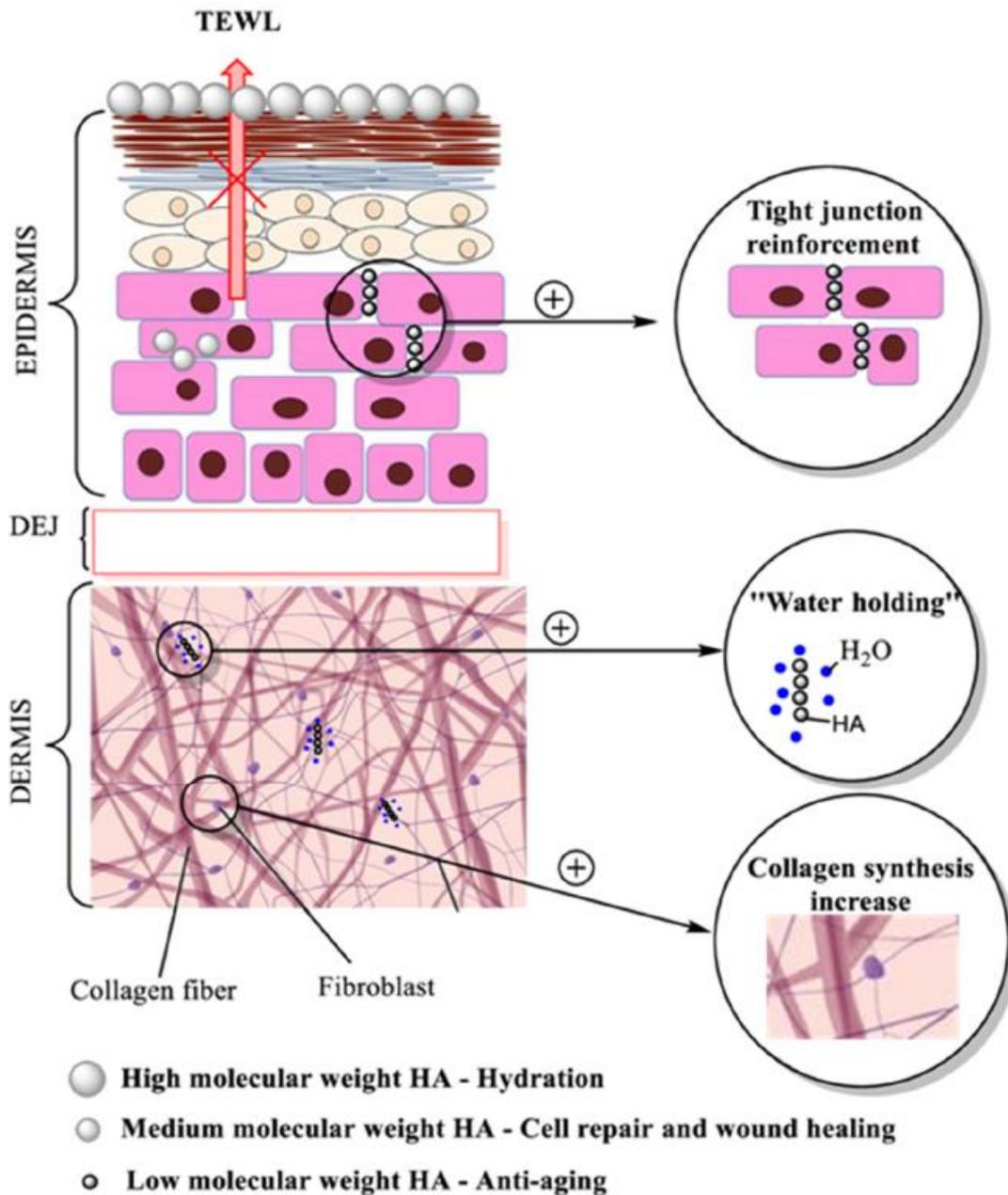


Figure 54 : Activité de l'acide hyaluronique sur la peau et effets revendiqués selon son poids moléculaire. (TEWL = Transepidermal Water loss ou perte d'eau transépidermique; DEJ = Dermoepidermal junction ou jonction dermo-épidermique) (194)

❖ Système de délivrance de médicament

Telle que déjà citée précédemment en 2.2.2, l'invention de Philip Dehayza et Cheng (190) peut également être appliquée pour la formulation de DDS contenant des ingrédients cosmétiques permettant de libérer progressivement une substance à la surface de la peau. Certaines préparations à usage topique sont disponibles dans le commerce et sont utilisées par exemple dans le traitement de la kératose actinique ou de l'inflammation de la peau. Il a été prouvé que l'AH permet d'améliorer la pénétration d'ingrédients actifs au travers de la couche cornée constituant une barrière à la pénétration des ingrédients lorsque administrés seuls (194).

2.3 Réglementations appliquées en France et en Europe

2.3.1 Réglementations et exigences générales

Bien qu'il ne s'agisse pas d'un texte réglementaire à proprement parler mais d'un guide, les BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) constituent le principal texte appliqué par les industries pharmaceutiques afin d'assurer la qualité, l'efficacité et la sécurité des médicaments et produits de santé (197). Ce texte s'appuie également sur certaines parties de l'ICH (« International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use » ou Conseil international pour l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain). Le rôle de l'ICH est d'harmoniser les réglementations pharmaceutiques à l'échelle mondiale, elle encourage également la reconnaissance mutuelle des données entre les autorités réglementaires des différents pays participants. Ainsi, dans sa troisième partie, les BPF se rapportent à l'ICH Q9 relative à la gestion du risque qualité et à l'ICH Q10 relative au système qualité pharmaceutique.

La pharmacopée européenne (**Annexe IV**) exige certaines caractéristiques pour l'AH pouvant varier selon son application (certaines caractéristiques ont déjà été présentées en 1.2 du présent chapitre). De la même manière, le « Handbook of Pharmaceutical Excipients » (9^{ème} édition) publié par la Pharmaceutical Press contient une monographie du hyaluronate de sodium utilisé en tant qu'excipient. Cette monographie présente des exemples d'utilisation de l'AH ainsi que ses caractéristiques en se basant sur la Pharmacopée européenne. Ces caractéristiques correspondent par exemple au pH, à la perte à la dessiccation ou encore à des limites de teneur en métaux et autres composées (Fer, Chlorures, protéines, acides nucléiques, GAG sulfatés, endotoxines).

2.3.2 Réglementations spécifiques aux dispositifs médicaux

Le 5 Avril 2017, des nouvelles réglementations relatives aux DM et DMDIV sont parues au niveau européen impliquant des modifications et des actions majeures à mener par les industriels afin de perpétuer la commercialisation de leurs produits sous le marquage « CE ».

Concernant les DM, le texte réglementaire correspondant est le règlement (UE) n° 2017/745 (198) plus généralement connu sous l'acronyme MDR (Medical Device Regulation). Selon la classification établit dans ce texte, les DM devront ou non être approuvés à l'utilisation par un organisme notifié. Ainsi, toutes les classes de DM nécessitent l'approbation d'un organisme notifié à l'exception des DM de classe I.

L'apparition de scandales, notamment celui des « Prothèses PIP » survenu entre 2009 et 2010, ont contribué en partie à la publication de ces nouvelles réglementations. Les implants mammaires, commercialisés par la société Poly Implant Prothèse (PIP) présentaient dans un premier temps un défaut de fragilité conduisant à leur rupture et libérant ainsi le gel contenu. Dans un second temps, le gel en question ne correspondait pas au type de gel déclaré dans le dossier de conception de l'entreprise, il s'agissait d'un gel de silicone artisanal non conforme aux réglementations en vigueur (199). Le 29 mars 2010, l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) connu aujourd'hui sous le nom de l'ANSM (Agence Nationale des Médicaments et des Produits de Santé) prend alors une décision de police sanitaire (DPS) en retirant les prothèses du marché (200). Ainsi, ces nouveaux textes réglementaires visent à garantir un niveau de sécurité et de protection élevé de la santé tout en favorisant l'innovation (201).

Parmi les textes permettant de répondre à ces réglementations, il est important de citer la norme **ISO 13485** relative au système de management de la qualité des dispositifs médicaux. Cette norme internationale permet à un organisme de concevoir un système de management de la qualité établissant et garantissant le maintien de l'efficacité de ses processus.

Concernant les organismes chargés de réguler les dispositifs médicaux, au niveau national il s'agit de l'ANSM tel que déjà évoquée précédemment. Ensuite, au sein de l'union européenne (UE), bien qu'elle régule principalement les médicaments, l'EMA (European Medicines Agency) est également impliquée dans la régulation de ces produits. Enfin, les organismes notifiées, agréés par les autorités compétentes, jouent un rôle crucial dans le processus d'évaluation de la conformité des dispositifs médicaux avant leur mise sur le marché.

2.3.3 Réglementations spécifiques aux médicaments

Lorsque l'AH est employé en tant que médicament, il peut être soumis à différents règlements selon le type et l'usage du médicament (médicament pédiatrique ou lors d'essais cliniques). Il peut s'agir des règlements suivants, issus du parlement européen et du conseil :

- **Règlement (CE) n° 726/2004** (202) établissant des procédures pour l'autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et instituant une agence européenne des médicaments (l'EMA).
- **Règlement (CE) n° 1901/2006** (203) concernant les médicaments à usage pédiatrique. Ce règlement établit un cadre réglementaire pour encourager la recherche et le développement de médicaments adaptés aux besoins spécifiques des enfants.
- **Règlement (UE) n° 536/2014** (204) concernant les essais cliniques de médicaments à usage humain. Ce règlement établit des règles harmonisées pour la conduite d'essais cliniques dans l'Union européenne.

Contrairement aux dispositifs médicaux et produits cosmétiques, il n'existe pas de norme ISO spécifiques aux médicaments. De nombreuses normes peuvent être appliquées telle que l'ISO 9001 citée précédemment, relative au système de management de la qualité.

Au niveau nationale, l'ANSM est chargée de la réglementation, de l'évaluation et de la surveillance des médicaments et des produits de santé. Au niveau européen, l'EMA est chargée de l'évaluation scientifique, de la supervision et de la surveillance des médicaments à usage humain et vétérinaires. Ces autorités sont également en mesure de délivrer ou non l'autorisation de mise sur le marché (AMM) des médicaments et produits de santé.

2.3.4 Réglementations spécifiques aux produits cosmétiques

Au sein de l'UE, les cosmétiques sont régulés par le règlement (CE) n° 1223/2009 (205) du parlement européen et du conseil et permet de garantir le fonctionnement du marché intérieur et d'assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine (206).

Afin de répondre à ces réglementations, plusieurs normes ISO communément utilisées dans les différents secteurs de l'industrie fournissent des lignes directrices (**ISO 9001** par exemple).

Spécifiquement aux produits cosmétiques, il existe plusieurs normes ISO permettant de répondre aux critères d'efficacité de sécurité et de qualité dont notamment :

- **L'ISO 22717** relative à la microbiologie des produits cosmétiques
- **L'ISO 16128** fournissant des lignes directrices pour l'évaluation des ingrédients cosmétiques et des produits finis d'origine naturelle et biologique
- **L'ISO 29621** fournissant des lignes directrices pour l'évaluation de l'efficacité des produits cosmétiques.

Concernant l'organisme régulant les produits cosmétiques, il s'agit de l'ANSM et de la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes). L'ANSM n'intervient pas directement mais peut collaborer avec la DGCCRF dans le cas où la sécurité du produit cosmétique est concernée et que cela relève de ses compétences, conformément à ses propres réglementations. Au niveau européen, des comités scientifiques tel que le « Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateur » sont chargés de fournir des avis scientifiques pour répondre à des questions relatives à la sécurité des produits cosmétiques.

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE – FORMULATION

D'UN SYSTEME DE DELIVRANCE DE MEDICAMENT

Les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés au sein de l'UMR 1229 - RMES (Regenerative Medicine and Skeleton) des laboratoires de l'INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). Les travaux sont présentés au format d'un article scientifique avec une **introduction** expliquant le but des expérimentations, la problématique rencontrée et les potentielles applications du système développé. Une partie **matériels et méthodes** détaillera les outils et matières utilisés pour formuler et caractériser le produit développé. Une partie **résultat** présentera les résultats bruts, interprétés en **discussion**, suivie d'une **conclusion**. L'abréviation AH (Acide Hyaluronique) est remplacée ici par l'abréviation HA (Hyaluronic Acid).

Résumé :

L'objectif de ces travaux est de synthétiser un hydrogel à base d'acide hyaluronique silanisé (HA-Si) pouvant être utilisé comme système de délivrance de la Lipoxine A4 (LXA4), une drogue lipophile aux propriétés anti-inflammatoires. Le principal défi de ces travaux consistait en l'association d'une matrice hydrophile (hydrogel) avec un composé lipophile (LXA4).

Pour relever ce défi, deux émulsions **MPE** et **SE** de type huile dans eau (H/E) ont été formulées afin de solubiliser la LXA4 dans la phase huileuse. La phase huileuse choisie correspond à du Miglyol 812, une huile biocompatible composée de triglycérides d'acide capriques et capryliques. Les deux émulsions sont obtenues selon deux méthodes de mélange, une première méthode mécanique, utilisant un mélangeur à pâles et une seconde méthode, manuelle, utilisant des seringues connectées par un système « Luer-Lock ».

Deux hydrogels **H-MPE** et **H-SE** à base d'HA-Si contenant respectivement les émulsions **MPE** et **SE** sont ensuite fabriqués et réticulés. Cette réticulation ou transition *sol-gel* est obtenue après diminution du pH du HA-Si présent initialement en solution basique. La diminution du pH provoque la condensation des fonctions silanols en fonctions siloxanes, créant ainsi des liaisons entre les différentes chaînes de polysaccharide. Il est ensuite supposé qu'une libération continue de la drogue lipophile peut avoir lieu *in vivo* via l'action de hyaluronidases et de radicaux libres permettant la dégradation de l'hydrogel dans un contexte inflammatoire lors d'une pulpite ou parodontite par exemple.

Mots clefs : Émulsion, Miglyol, Hydrogel, Acide Hyaluronique, Lipoxine A4, pulpite, parodontite

1 Introduction

En odontologie, il existe deux pathologies inflammatoires avec un forte prévalence :

- La **pulpite**, une inflammation de la pulpe dentaire à l'origine de douleurs dentaires aiguës intenses telle que la rage de dent. Cette pathologie constitue l'une des principales causes de douleurs oro-faciales et peut conduire à une utilisation excessive et inappropriée des analgésiques opioïdes (207).
- La **parodontite**, dont l'inflammation cible la gencive ainsi que les structures de support de la dent (os alvéolaire). Il s'agit de la sixième maladie en termes de prévalence dans le monde ainsi que de la maladie osseuse la plus communément rencontrée chez l'homme (208). La parodontite est également la cause primaire de la perte de dents chez l'adulte (209) avec des conséquences économiques et médicales importantes (**Figure 55**).

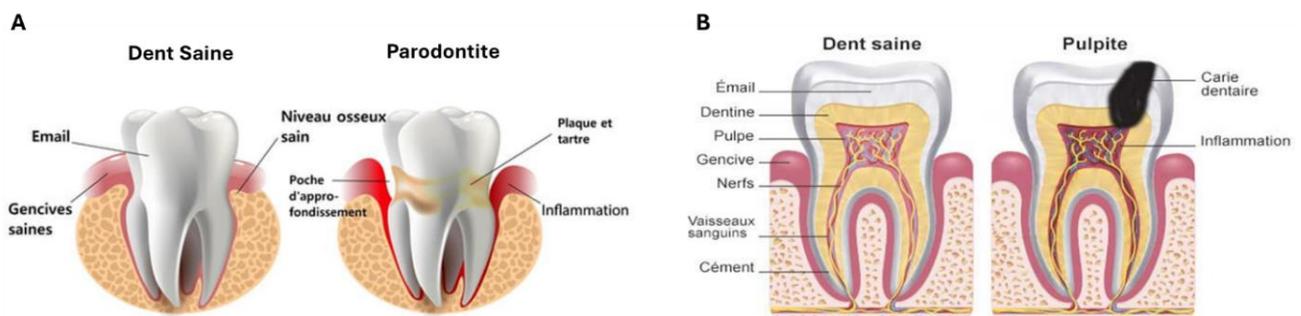


Figure 55 : A - Comparaison de la structure des tissus environnant une dent saine et une dent atteinte de parodontite (210). B - comparaison des tissus internes entre une dent saine et une dent atteinte de pulpite (211).

Lorsque l'inflammation devient chronique, il existe un processus de cicatrisation et de fibrose (formation de tissus fibreux) empêchant le retour à l'homéostasie (212). Des travaux menés lors des dernières décennies ont montré que le traitement de l'inflammation aiguë est crucial afin de prévenir l'inflammation chronique et de permettre une régénération des tissus de soutien (213).

Les macrophages jouent un rôle important dans ces pathologies, ils sont considérés comme les effecteurs primaires de la régulation de l'inflammation. Ils sont capables de passer d'un phénotype M1 pro-inflammatoire vers un phénotype M2 anti-inflammatoire favorisant la régénération des tissus (214–216).

Récemment, le rôle immunomodulateur des Lipoxines a été mis en évidence. Par exemple, la LXA4 (**Figure 56**) est une molécule anti-inflammatoire faisant partie de la famille des médiateur bioactifs spécialisés de la résolution de l'inflammation, les SPM (Specialized pro-resolving mediators).

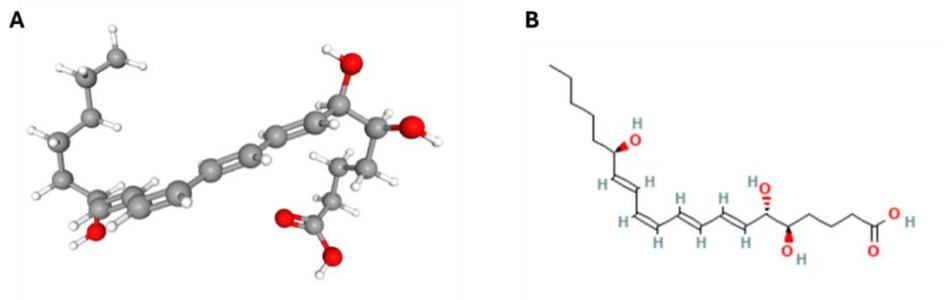


Figure 56 : Structure moléculaire de la Lipoxine A4 (A : Structure 3D et B : Structure 2D) (217).

Elle est synthétisée en partie par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages et dérive de l'acide arachidoniques présent dans la membrane plasmique (**Figure 57**).

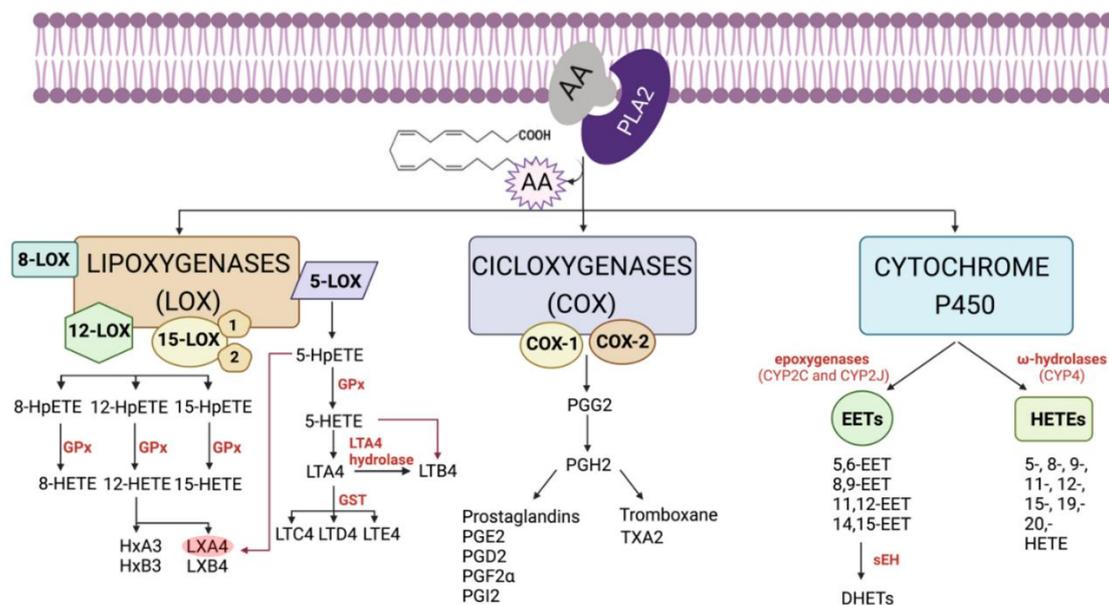


Figure 57 : Biosynthèse de la Lipoxine A4 à partir de l'AA de la membrane plasmique (AA = Acide Arachidonique ; CYP = Cytochrome P ; EETs = Acide époxyeicosatriénoïque ; GPx = Glutathion peroxydase ; GST = Glutathion S-transférase, HETEs = acides hydroeicosatétraénoïques ; HpETE = Acides hydroperoxy-eicosatétraénoïques ; PLA2 = Phospholipase A2) (218).

Concernant ses fonctions biologiques, la LXA4 permet la diminution du recrutement des monocytes, l'induction des macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire (219,220), l'inhibition des fonctions des cellules dendritiques (221), la modulation du système immunitaire adaptatif via la diminution de la réponse des lymphocytes B mémoire (222). Ainsi, il est supposé qu'un apport exogène en LXA4 permettrait de réguler l'inflammation lors d'une pulpite ou d'une parodontite (**Figure 58**).

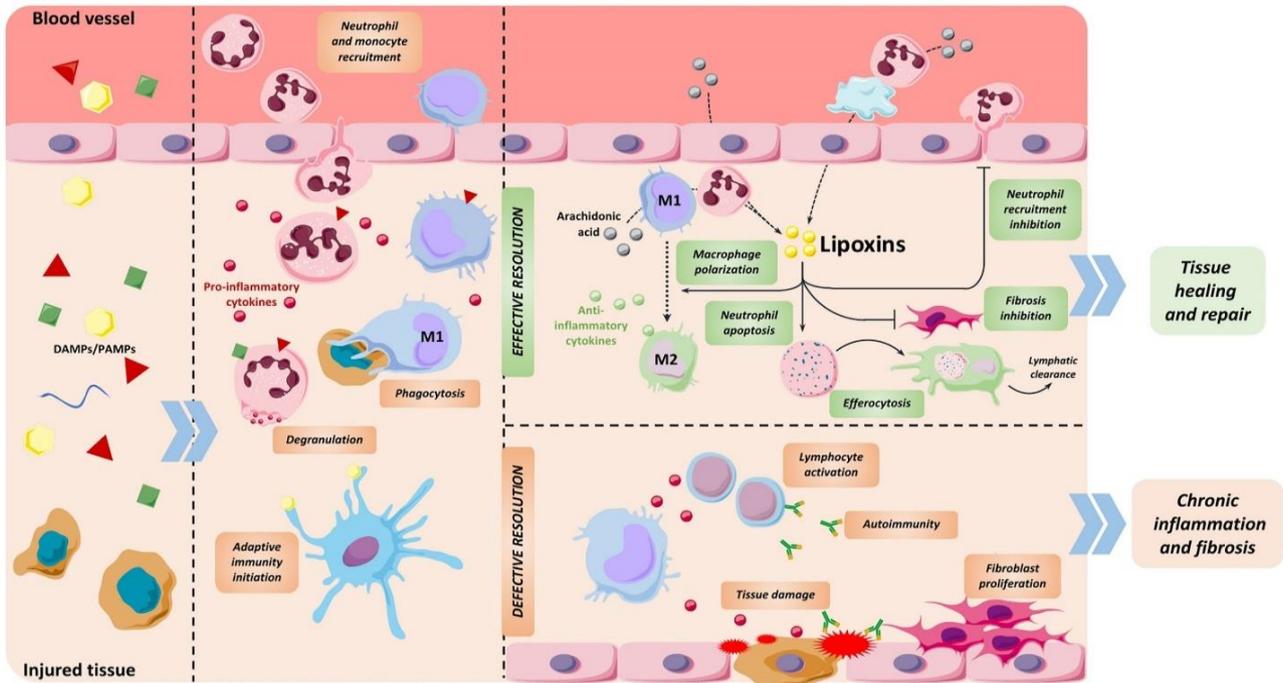


Figure 58 : Rôle des Lipoxines dans le processus de l'inflammation (223).

La libération d'agents pathogènes et de motifs moléculaires associés aux dommages (PAMP et DAMP) par les tissus lésés déclenche l'inflammation en favorisant le recrutement de neutrophiles, puis de monocytes. Ces cellules immunitaires neutralisent la source du dommage en exerçant différentes fonctions comme la dégranulation pour libérer des substances toxiques, la phagocytose, la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'initiation de la reconnaissance des antigènes. À la fin de cette phase, les cellules immunitaires passent à un phénotype résolutif, générant des Lipoxines et d'autres SPM qui contribuent à la fin de la réponse inflammatoire. Pendant la résolution, ces composés empêchent le recrutement des neutrophiles et induisent leur apoptose, polarisent les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (M2), favorisent l'efferocytose (phagocytose des cellules apoptotiques) et inhibent la prolifération des fibroblastes. En conséquence, les tissus sont réparés de manière appropriée. Si la phase de résolution est défectueuse ou insuffisante, les stimuli pro-inflammatoires persistent et finissent par endommager le tissu, provoquant une inflammation chronique, puis une fibrose et un dysfonctionnement de l'organe.

Afin de développer un SDM, l'AH a été choisie comme polymère d'intérêt, il est biocompatible et biodégradable grâce aux hyaluronidases présentes *in vivo* (179,224). Il contribue également à la régulation de l'homéostasie (225), l'homing cellulaire (226) et l'inflammation (227). De plus, il est facilement modifiable chimiquement par diverses techniques telle que la silanisation.

La silanisation consiste à greffer par voie chimique des groupements silanols ($\text{Si}(\text{OH})_3$) sur un polymère tel que l'HA et permet d'obtenir de l'acide Hyaluronique silanisé (HA-Si). La réticulation peut ensuite avoir lieu via la condensation des fonctions silanols après abaissement du pH d'une solution basique d'HA-Si (Figure 59). La formation progressive de liaisons covalentes de type siloxanes (S-O-S) permet ensuite d'obtenir un hydrogel selon la transition d'une solution en hydrogel (transition *sol-gel*). L'avantage de cette transition *sol-gel* serait de faciliter l'injection *in situ* à travers une aiguille 23G ou 18G (228) à partir d'un précurseur non gélifié et peu visqueux, plus facilement injectable qu'un gel réticulé. Une fois administré, le précurseur en cours de réticulation formerait un hydrogel solide, maintenu en place au site d'injection tout en permettant un contrôle de la libération de la substance active qu'il contient.

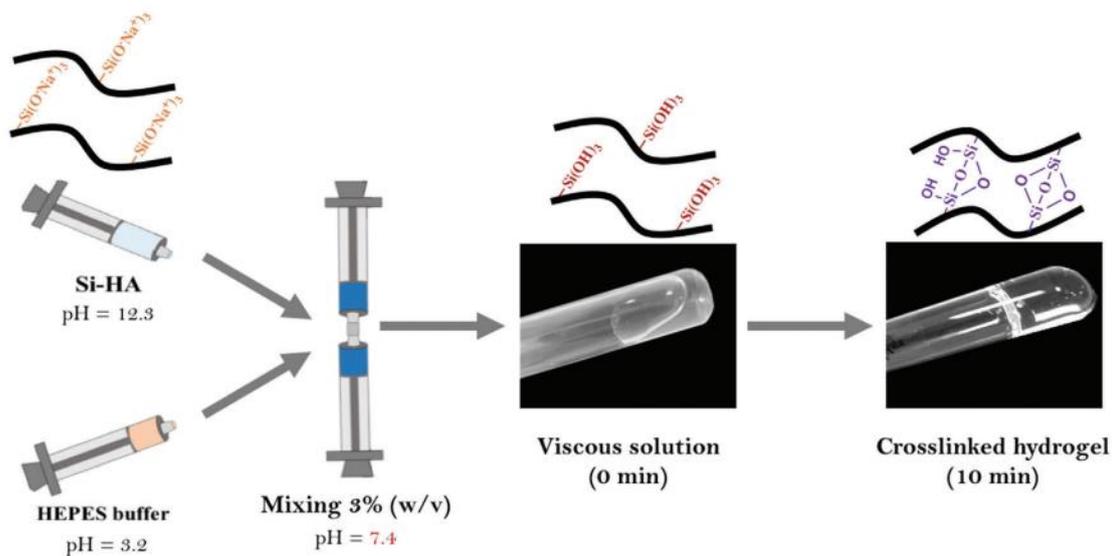


Figure 59 : Schéma de la méthode de réticulation d'un hydrogel d'acide hyaluronique silanisé (228).

L'objectif de ce projet est de développer un nouveau SDM pour une molécule lipophile telle que la LXA4. La formulation d'un tel système permettrait de protéger la molécule de son environnement, dont les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et autre radicaux libres présents lors d'une inflammation. Ce système permettrait également de contrôler sa libération et de prolonger son effet pharmacologique sur l'inflammation. La forme pharmaceutique développée et proposée ici correspond à un hydrogel injectable par voie locale à base d'HA dont l'indication pourrait correspondre à la résolution de l'inflammation, lors d'une pulpite ou une parodontite par exemple.

La problématique associée à la formulation de ce SDM consiste en l'encapsulation d'une molécule lipophile dans une matrice hydrophile constituée par l'HA. En effet, la plupart des hydrogels développés permettent l'encapsulation de molécule hydrophiles plutôt que lipophiles (229).

Pour répondre à cette problématique, différentes émulsions de type huile dans eau (H/E) seront d'abord formulées afin d'encapsuler la LXA4 dans des globules lipidiques (phase huileuse), dispersés dans une phase aqueuse. Cette émulsion sera ensuite intégrée dans une matrice d'hydrogel à base d'HA, modifié chimiquement par silanisation.

2 Matériels et méthodes

2.1 Formulation et caractérisation des émulsions

❖ Phase huileuse

La phase huileuse de chaque émulsion est composée de Miglyol 812™, fourni gracieusement par la société *IOI Oleochemical*. Il s'agit d'une huile biocompatible utilisée en nutrition parentérale entre autres. Cette huile est composée de triglycérides d'acides capriques (C10) et capryliques (C8).

❖ Phase aqueuse

La phase aqueuse des émulsions a été fabriquée à l'aide de plusieurs composants solubilisés dans de l'eau purifiée (**Figure 60**) :

- Montanox 20™ : Tween 20 ou encore Polysorbate 20, fourni gracieusement par la société *Seppic*. Il s'agit d'un tensioactif hydrosoluble avec une balance lipophile-hydrophile (HLB) de 16,7 (un tensioactif avec une HLB comprise entre 1 et 6 est considéré lipophile, plus cette valeur est élevée, plus le tensioactif est hydrosoluble).
- Methocel™ E4M : Hypromellose ou HydroxyPropylMéthylCellulose (HPMC) fournie par *Colorcon*. L'HPMC a été utilisée comme agent viscosifiant mais aussi pour ses propriétés tensioactives.

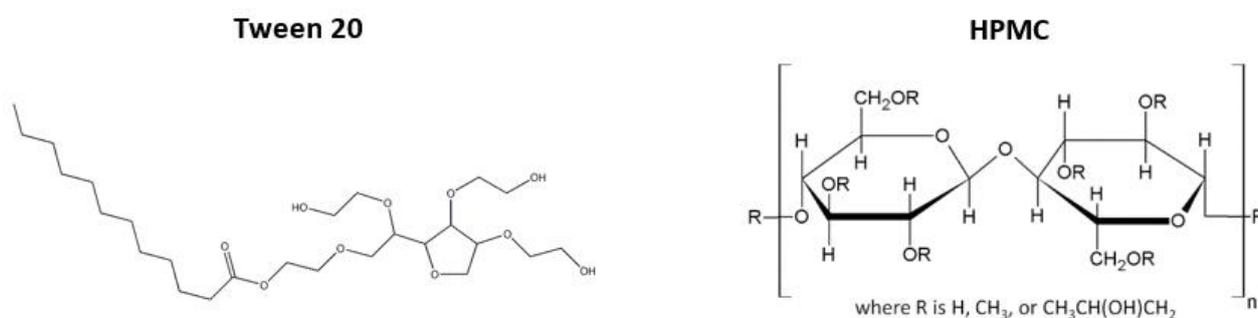


Figure 60 : Structures chimiques du Tween 20 (à gauche) (230) et de l'HPMC (à droite) (231).

Les émulsions ont été formulées en utilisant deux techniques de mélange afin de disperser la phase huileuse dans la phase aqueuse (émulsions de type H/E) :

- Mélanges à l'aide d'un mélangeur à pâles (tige à 4 hélices rectangulaires fixées à un moteur) permettant d'obtenir les émulsions de type « **MPE** ».
- Mélanges à l'aide de seringues connectées par un système « Luer-Lock » permettant d'obtenir les émulsions de type « **SE** ».

2.1.1 Fabrication avec un mélangeur à pales

❖ Formulation d'une série d'émulsions MPE1 à MPE6

Une série d'émulsions est produite afin de déterminer le ratio de volume de phase aqueuse (E) sur la phase huileuse (H) permettant d'obtenir l'émulsion la plus stable (**Tableau III**). La phase aqueuse est composée ici par le Montanox et l'eau purifiée. La phase huileuse contient uniquement le Miglyol. La quantité de tensioactif (Montanox ou Tween 20) et le volume final sont constants. Seules les proportions des phases aqueuses et huileuses varient de MPE1 à MPE6.

Chaque émulsion est fabriquée à température ambiante (environ 21°C) selon le protocole décrit ci-dessous, dans l'ordre indiqué par numérotation :

1. Préparation de la phase aqueuse avec ajout du Tween 20 dans l'eau purifiée mélangée ensuite pendant 10 min à 400 rpm à l'aide d'un mélangeur à pâles.
2. Ajout goutte à goutte de la phase huileuse (Miglyol) sous agitation.
3. Poursuite du mélange après ajout de la phase huileuse pendant 30 min à 400 rpm.

Identifiant	Montanox (mL)	Montanox (g)	Eau purifiée (mL)	Miglyol (mL)	Miglyol (g)	Ratio des volumes $\left(\frac{E}{H}\right)$	Volume final (mL)
MPE1	10,0	11,0	32,9	7,1	6,8	6	50,0
MPE2	10,0	11,0	31,7	8,3	7,9	5	50,0
MPE3	10,0	11,0	30,0	10,0	9,5	4	50,0
MPE4	10,0	11,0	27,5	12,5	11,8	3	50,0
MPE5	10,0	11,0	23,3	16,7	15,8	2	50,0
MPE6	10,0	11,0	20,0	20,0	18,9	1,5	50,0

Tableau III : Composition des formulations des émulsion MPE1 à MPE6.

Afin de faciliter les prélèvements, les composants sont pesés à l'aide d'une balance de précision. Les masses à peser selon le volume désiré sont obtenues par conversion à l'aide des masses volumiques suivantes :

- Miglyol : $\rho = 0,95 \text{ g.mL}^{-1}$
- Tween 20 : $\rho = 1,10 \text{ g.mL}^{-1}$
- Eau purifiée : $\rho = 1,00 \text{ g.mL}^{-1}$

❖ Ajout de l'HPMC dans la phase aqueuse

La formulation de l'émulsion MPE6 (ratio $E \div H = 1,5$) est reprise ici pour réaliser plusieurs essais avec ajout d'HPMC dans la formulation. Pour cela, différentes concentrations de solutions aqueuses d'HPMC sont testées (**Tableau IV**). La quantité totale d'émulsion préparée pour chaque essai est ici de 50 g au lieu de 50 mL. L'utilisation de masses au lieu de volumes a pour but de simplifier les mesures et d'apporter plus de précision pour le prélèvement des différents composants. Le ratio de 1,5 entre la phase aqueuse et la phase huileuse est conservé mais ce dernier est calculé à partir des masses et non des volumes.

Identifiant	Montanox (g)	Solution aqueuse HPMC (g)	Concentration HPMC (% m/m)	Miglylol 812 (g)	Quantité finale (g)
MPE6-HPMC1	10,0	20,0	0,5	20,0	50,0
MPE6-HPMC2	10,0	20,0	1	20,0	50,0
MPE6-HPMC3	10,0	20,0	1.5	20,0	50,0
MPE6-HPMC4	10,0	20,0	2	20,0	50,0
MPE6-HPMC5	10,0	20,0	2,5	20,0	50,0
MPE6-HPMC6	10,0	20,0	3	20,0	50,0

Tableau IV : Composition des formulations des émulsions MPE6-HPMC1 à MPE6-HPMC6 avec différentes solutions aqueuses d'HPMC.

Les différentes solutions aqueuses d'HPMC sont préparées selon le protocole décrit ci-dessous :

1. Solubilisation de l'HPMC dans un bécher à l'aide d'un mélangeur à pâles pendant une heure à 400 rpm à température ambiante.
2. Mélange à faible vitesse pendant une nuit entière (environ 12 heures) à l'aide d'un mélangeur rotatif.
3. Stockage au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures (dégazage des solutions et amélioration de la solubilisation de l'HPMC à froid).

Chaque émulsion est ensuite fabriquée selon le protocole décrit précédemment en 2.1.1 avec l'eau purifiée remplacée par les solutions aqueuses d'HPMC. Les solutions d'HPMC sont sorties du réfrigérateur 10 min avant utilisation afin de les amener à température ambiante.

❖ Étude de l'impact du tensioactif et de la température de fabrication

La formulation de l'émulsion MPE6-HPMC5 est sélectionnée pour tester différentes conditions de fabrication. Au total, quatre conditions sont testées en fonction de la présence ou l'absence de tensioactif et de la température de fabrication (**Tableau V**). Pour les émulsions ne contenant pas de Tween 20, la quantité de phase aqueuse correspond uniquement à la quantité de solution d'HPMC, soit 20 g. De ce fait un rapport de masse de 1:1 entre la phase huileuse et la phase aqueuse est testé ici (ratio $E \div H = 1$).

Température	Montanox (g)	Solution aqueuse HPMC 2,5 % (g)	Miglyol 812 (g)	Quantité finale (g)
Température ambiante 21 °C	10,0	20,0	20,0	50,0
	0,0	20,0	20,0	40,0
Bain Marie 37 °C	10,0	20,0	20,0	50,0
	0,0	20,0	20,0	40,0

Tableau V : Composition des formulations de MPE6-HPMC5 selon quatre méthodes de fabrication.

Méthode de fabrication des émulsions au bain marie à **37 °C** :

- **En présence de Tween20** : La solution d'HPMC est préchauffée 10 min avant mélange avec le Tween 20. Le Tween 20 est ensuite ajouté à la solution d'HPMC et le mélange est réalisé à 400 rpm pendant 10 min. Le Miglyol est préchauffé puis ajouté goutte à goutte sous agitation. Le mélange est poursuivi pendant 30 min hors du bain marie.
- **En absence de Tween20** : l'HPMC et le Miglyol sont préchauffés pendant 10 min. le Miglyol est ensuite ajouté goutte à goutte sous agitation à 400 rpm et le mélange est poursuivi hors du bain marie pendant 30mn.

Méthode de fabrication des émulsions à température ambiante à **21 °C** :

- **L'émulsion fabriquée sans Tween 20** consiste simplement à ajouter le Miglyol goutte à goutte dans l'HPMC sous agitation à 400 rpm puis de poursuivre le mélange pendant 30mn.
- **L'émulsion fabriquée en présence de Tween 20** correspond à une répétition de l'émulsion MPE6-HPMC5, elle est reproduite ici comme témoin de l'expérience.

DANS LA SUITE DE CETTE ÉTUDE, L'ÉMULSIONS MPE6-HPMC5 FORMULÉE SANS TENSIOACTIF A TEMPÉRATURE AMBIANTE EST SELECTIONNÉE ET SERA NOMMÉE « MPE ».

2.1.2 Fabrication avec seringues connectées

❖ Formulation de SE6

L'émulsion MPE6 est reproduite en utilisant des seringues connectées par système « Luer-Lock » pour réaliser les différents mélanges. La capacité du volume des seringues étant limitée (3 mL), les volumes utilisés avec cette méthode sont dix fois plus faibles que ceux utilisés avec le mélangeur à pâles. Cependant, les proportions des volumes en phase aqueuse et huileuse sont conservées.

Pour préparer cette émulsion, **1 mL** de tensioactif est prélevé dans une première seringue et **2 mL** d'eau purifiée sont prélevés dans une seconde seringue. Les deux seringues sont connectées l'une à l'autre à l'aide d'un système « luer-lock ». Le mélange est obtenu en effectuant environ 20 allers-retours pour obtenir la phase aqueuse, conservée ensuite dans l'une des deux seringues. La seringue de phase aqueuse est ensuite connectée avec une troisième seringue, contenant **2mL** de Miglyol. Le mélange entre la phase aqueuse et le Miglyol est réalisé en effectuant environ 30 allers-retours. L'émulsion est ensuite stockée à température ambiante à l'abri de la lumière.

❖ Ajout de l'HPMC dans phase aqueuse

De la même manière que les émulsions type MPE, des essais de formulations avec différentes concentrations de solutions aqueuses d'HPMC sont réalisés. La proportion en volume eau/huile de l'émulsion SE6 est reprise pour mener ces tests. Six émulsions (SE6-HPMC1 à SE6-HPMC6) au total sont formulées (**Tableau VI**) selon le même protocole décrit ci-dessus.

Identifiant	Montanox (mL)	solution aqueuse HPMC (mL)	Concentration HPMC (% m/m)	Miglylol 812 (mL)	Volume final (mL)
SE6-HPMC1	1,0	2,0	0.5	2,0	5,0
SE6-HPMC2	1,0	2,0	1	2,0	5,0
SE6-HPMC3	1,0	2,0	1,5	2,0	5,0
SE6-HPMC4	1,0	2,0	2	2,0	5,0
SE6-HPMC5	1,0	2,0	2,5	2,0	5,0
SE6-HPMC6	1,0	2,0	3	2,0	5,0

Tableau VI : Composition des formulations des émulsions SE6-HPMC1 à SE6-HPMC6.

❖ Étude de l'impact du tensioactif

De la même manière que pour l'émulsion MPE6-HPMC5, une amélioration de la stabilité de l'émulsion SE6-HPMC5 a été étudiée. La méthode testée ici consiste simplement à supprimer le tensioactif. Les tests de fabrication de cette émulsion au bain-marie (avec ou sans Tween20) ne sont pas réalisés ici car cette méthode n'est pas applicable aux mélanges avec des seringues.

Ainsi, deux émulsions ont été produites :

- La première émulsion correspond à une reproduction de SE6-HPMC5 sans les 1ml de tensioactif. La formulation de cette émulsion est donc réalisée en mélangeant 2mL de solution d'HPMC 2,5 % et 2 mL de Miglylol. Le mélange est réalisé en effectuant environ 30 allers-retours.
- La seconde émulsion correspond à une répétition de SE6-HPMC5 et sert de témoin pour cette expérience.

DANS LA SUITE DE CETTE ÉTUDE, L'ÉMULSION SE6-HPMC5 FORMULÉE AVEC TENSIOACTIF À TEMPÉRATURE AMBIANTE EST SELECTIONNÉE ET SERA NOMMÉE « SE »

2.1.3 Encapsulation du Nile Red dans les globules lipidiques

Le **Nile Red** utilisé pour l'observation des globules lipidiques en macroscopie à fluorescence est fourni par *Thermofischer*. Il s'agit d'un colorant lipophile émettant une couleur rouge/orange après excitation avec une longueur émettant dans le bleu.

Le caractère lipophile de ce colorant a permis sa solubilisation dans la phase huileuse. Cette coloration a pour but de simuler l'encapsulation d'une molécule lipophile telle que la LXA4 et d'observer s'il existe ou non un phénomène de diffusion de la phase huileuse vers la phase aqueuse.

Pour réaliser cette coloration, le Nile Red présent sous forme de poudre est directement solubilisé dans le Miglylol sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 10 min à 400 rpm. Une solution mère est ainsi préparée avec une concentration finale de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les émulsions **SE** et **MPE** ont été formulées à l'aide de cette solution pour composer la phase huileuse. La méthode de fabrication des émulsions reste telle que décrite précédemment en 2.1.1 (mélangeur à pâles) et 2.1.2 (seringues connectées).

2.1.4 Tests de stabilité par centrifugation

Afin de simuler une accélération du vieillissement, des tests de stabilité par centrifugation ont été réalisés. Chaque test est réalisé après un temps de maturation des émulsions d'au moins 24 heures après fabrication. Lorsqu'une séparation de phases était observée, la phase supérieure des échantillons a été prélevée. Les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min avec une force centrifuge relative (RCF) d'environ 2600 g.

Le RCF est calculé à partir de la formule suivante selon la référence (232) :

$$RCF = 1,12 \times r \times \left(\frac{rpm}{1000}\right)^2$$

Avec :

- Rayon du rotor : $r = 145 \text{ mm}$
- Rotation par minute : $rpm = 4000 \text{ tr. min}^{-1}$

2.1.5 Observations microscopiques et macroscopiques

❖ Aspect Macroscopique

L'aspect macroscopique des émulsions est observé à l'œil nu directement après fabrication puis au bout de 24 heures. Les émulsions présentant une bonne stabilité (supérieure à 24 heures) ont pu être observées pendant plusieurs jours.

❖ Microscopie optique

Les émulsions sont observées à l'aide d'un microscope optique et d'un microscope numérique (*VHX-7000, KEYENCE*) entre lame et lamelle. Quelques gouttes d'émulsion sont déposées directement sur une lame de verre ou après dispersion au 1/10^{ème} ou au 1/100^{ème} avec de l'eau purifiée selon la densité des globules. Cette dispersion permet de mieux observer les globules lipidiques dans le cas où ces derniers sont trop denses et par conséquent difficilement distinguables.

❖ Macroscopie à fluorescence

Les émulsions SE et MPE encapsulant le Nile Red sont observées à l'aide d'un macroscopie à fluorescence (*Zeiss Axio Zoom v16*). L'échantillon observé pour l'émulsion SE est dispersé au 1/10^{ème} avec de l'eau purifiée alors que celui de l'émulsions MPE a été dispersée au 1/100^{ème}. Une dispersion plus importante de l'émulsion MPE a été nécessaire afin de ne pas saturer les images par la fluorescence des globules lipidiques.

2.1.6 Mesure de la taille des globules lipidiques

Les échantillons ont été analysés par l'équipe du département de biophysique et de Pharmacie galénique de l'UFR des sciences pharmaceutique de Nantes. La taille des globules lipidiques des émulsions **SE** et **MPE** est mesurée par diffraction de la lumière à l'aide d'un granulomètre laser (Malvern Mastersizer 3000) capable de mesurer des tailles de particules comprises entre 0,01 et 1000 μm . Les échantillons à analyser ont été fournis après dilution au $1/10^{\text{ème}}$ dans de l'eau purifiée. Une analyse par voie liquide a été réalisée en utilisant le module hydro MV de l'appareil, le liquide de suspension correspond à de l'eau purifiée d'indice de réfraction 1,33. Compte tenu de la composition des particules (globules), l'indice de réfraction de l'échantillon a été estimé à une valeur de 1,45, l'indice d'absorption à 0,001 et sa densité à 1. Ces valeurs sont ensuite utilisées par l'appareil pour mesurer les tailles de globules lipidiques.

Les analyses ont été réalisées selon la méthode décrite ci-dessous :

- Les échantillons sont retournés cinq fois manuellement avant analyse.
- Le prélèvement est effectué à l'aide d'une pipette pasteur plastique.
- L'échantillon est ajouté dans une cuve de mesure contenant de l'eau afin d'homogénéiser les différentes prises d'essais.
- La vitesse d'agitation de l'échantillon dans la cuve est fixée à $1000 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$
- Les analyses sont réalisées dès que l'obscurité est jugée stable et suffisante.
- Cinq mesures sont réalisées pour chaque échantillon.

2.1.7 Étude d'une alternative au Tween 20 : Poloxamère 188

L'utilisation du Poloxamère 188 (10%) fourni par la société *Corning* a été étudié comme alternative au Tween 20. Le Poloxamer est un tensioactif non ionique utilisé en culture cellulaire avec une HLB égale à 29 (233). Il s'agit d'un copolymère non-ionique à trois blocs (234) avec un bloc central hydrophobe de polypropylène glycol et deux blocs externes hydrophiles de polyéthylène glycol (**Figure 61**). Ce tensioactif est testé dans la formulation de l'émulsion **SE6-HPMC5** telle que décrite en 2.1.2 en remplaçant les 1 mL de tween 20 par 1 mL de solution de Poloxamer 188 (10%).

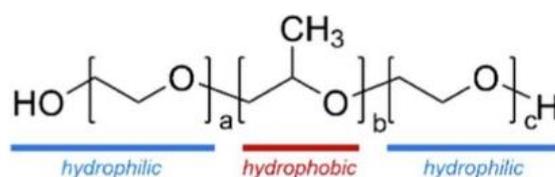


Figure 61 : Structure chimique du Poloxamère 188 (234).

2.2 Fabrication et caractérisation des hydrogels H-MPE et H-SE

L'**acide Hyaluronique silanisé** (HA-Si) a été synthétisé par l'équipe de chercheur du laboratoire RMES. L'HA utilisé pour cette synthèse provient de la société HTL et son poids moléculaire est de 51 kDa. Le nombre d'équivalents de réactifs (DMTMM :APTES) permettant la silanisation et conditionnant son degré de substitution tel que décrit dans la référence (228), est ici de trois équivalents (3:3 eq). Le degré de substitution résultant est compris entre 20 et 30 %.

La **soude (NaOH)** utilisée pour solubiliser du HA-Si est préparée à une concentration de 0,1 M

Une solution « **tampon G'** » est préparée en solubilisant 0,8000 g d'HEPES et 0,1753 g de NaCl dans 2,2 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 M. La solution acide est d'abord ajoutée dans de l'eau distillée puis complétée jusqu'à 10 mL. Le pH finale du tampon préparé est d'environ 4,4.

2.2.1 Synthèse des hydrogels HA-Si

❖ Solubilisation du HA-Si :

A l'aide d'une balance de précision, 0,04 g d'HA-Si est pesé puis solubilisé dans une seringue de 3 mL contenant 0,8 mL de soude 0,1 M. La solubilisation a lieu une nuit entière à l'aide d'un agitateur à tubes réglé sur 10 tr.min⁻¹. La concentration finale obtenue de solution basique d'HA-Si est de 5% (m/v)

❖ Mélange avec les émulsions

Un volume de 1 mL d'émulsion MPE ou SE est prélevé dans une première seringue de 3mL puis mélangé avec 0,8mL de solution basique d'HA-Si contenu dans une seconde seringue de 3mL. Les deux seringues sont ensuite connectées à l'aide du système « Luer-Lock ». Le mélange est obtenu en effectuant environ une vingtaine d'allers-retours.

❖ Réticulation du HA-Si

Le mélange « **émulsion/HA-Si** » obtenu précédemment est mélangé avec 0,2 mL de tampon G' afin d'initier la réticulation du polymère aboutissant *in fine* à la formation d'un hydrogel avec un pH proche de 7. Le mélange est réalisé en effectuant une dizaine d'allers-retours. Les hydrogels obtenus ont une concentration finale en HA-Si de 2% (m/v) et sont stockés dans leur seringue à température ambiante, à l'abri de la lumière.

2.2.2 Mesures rhéologiques

Les mesures rhéologiques permettent ici de déterminer le point de gélification (transition sol-gel) et sont effectuées à température ambiante (21°C) à l'aide d'un rhéomètre rotatif HAAKE MARSTM équipé d'une géométrie cône/plan 60 mm 1° en titane. Une contrainte constante de 1 Pa est appliquée sur une gamme de mesure comprenant 5 fréquences : 0,3 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,8 et 3,2 Hz.

Les hydrogels H-MPE et H-SE sont injectés directement après mélange du tampon G' sur la plan Peltier du rhéomètre. Le temps de gélification ou point de gel est déterminé graphiquement lorsque $\tan(\delta)$ est indépendant de la fréquence. De manière simplifiée, ce temps correspond grossièrement ici à l'intersection des courbes des modules G' et G'' avec G' devenant supérieur à G''. Les mesures sont ensuite stoppées lorsque le module G' atteint une phase plateau.

2.2.3 Mesure de l'injectabilité

Cette expérience est réalisée à l'aide d'un analyseur de texture (TAHD+, Stable Micro Systems, UK) permettant de déterminer la force d'injection (N) nécessaire pour injecter les hydrogels au travers des seringues. L'injectabilité des hydrogels H-MP et H-SE est mesurée en utilisant des aiguilles 18G et 23G. L'aiguille 18G est en métal, de forme rectiligne tandis que l'aiguille de 23G est en plastique avec une légère courbure et correspondent à des aiguilles utilisées en chirurgie dentaire. Les mesures sont réalisées après réticulation complète des hydrogels soit environ une heure après reconstitution du mélange « émulsion/HA-Si/tampon G' » selon les paramètres suivants :

- Vitesse d'injection : 2 mm.s⁻¹,
- Volume total d'injection : 1,8 mL
- Temps de mesure : 12 s
- Température ambiante : 24 °C

2.2.4 Observations en microscopie optique et macroscopie à fluorescence

❖ Microscopie optique

Les hydrogels H-MPE et H-SE sont observés à l'aide d'un microscope numérique (VHX-7000, KEYENCE) après réticulation. Une coupe d'échantillon aussi fin que possible est prélevée puis écrasé entre lame et lamelle.

❖ Macroscopie à fluorescence

Les hydrogels H-MPE et H-SE fabriqués partir des émulsions **SE** et **MPE** encapsulant le Nile Red sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence (*Zeiss Axio Zoom v16*). Comme précédemment, une coupe fine des échantillons de gel réticulé est réalisée puis observée entre lame et lamelle.

2.2.5 Observation en CryoMEB

La CryoMEB (Microscopie électronique à balayage par cryogénéisation) est une technique de congélation-lyophilisation permettant d'observer la surface d'un échantillon sans étape de métallisation (235). La surface « naturel » de l'échantillon peut ainsi être préservée et observée. Les échantillons ont été préparés et observés par l'équipe experte en CryoMEB du laboratoire RMES. De fines coupes sont réalisées sur les échantillons d'hydrogel puis cryogénisés dans de l'azote afin d'obtenir une structure amorphe, non cristallisée. Les échantillons d'hydrogels cryogénisés sont ensuite observés avec une tension d'accélération de 2,00 kV (kilo Volt).

3 Résultats

3.1 Émulsions

3.1.1 Formulation des séries d'émulsions

❖ Formulation de la série d'émulsions MPE1 à MPE6

Les émulsions MPE1 à MPE6 n'ont pas permis d'obtenir une stabilité supérieure à 24 heures (séparation de phases). Environ 4 jours après fabrication, l'émulsion MPE6 (**Figure 62**) est l'émulsion montrant la séparation de phase la moins importante. Son observation en microscopie optique, directement après fabrication, permet de visualiser la présence de globules lipidiques en nombre important.

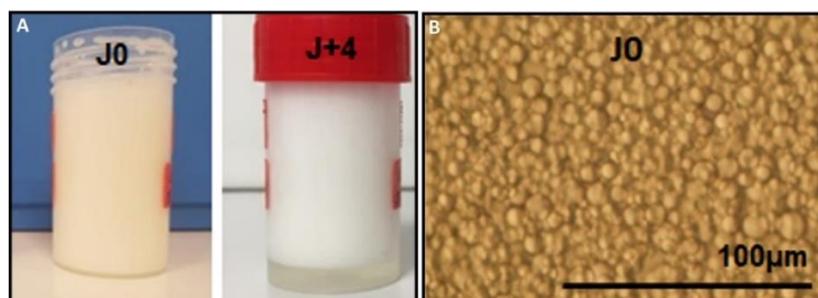


Figure 62 : Émulsion MPE6 – A : Aspect macroscopique à J0 puis J4. B : Observation en microscopie optique à J0.

❖ Fabrication de SE6 (Transfert de la formulation de l'émulsion MPE6)

L'émulsion SE6, reprenant les mêmes proportions de phase aqueuse et huileuse que l'émulsion MPE6, montre une stabilité d'au moins 4 jours post fabrication (**Figure 63**). L'observation de cette émulsion au microscope optique met en évidence la présence de globules lipidiques avec une densité élevée, difficilement observables à cause de leurs mouvements entre les lames de verre.

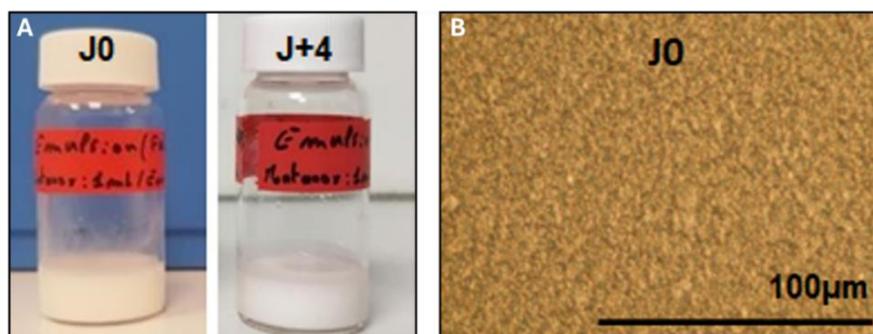


Figure 63 : Émulsion SE6 – A : Aspect macroscopique à J0 puis J4. B : Observation en microscopie optique à J0.

❖ Formulation d'une série d'émulsion après ajout de l'HPMC dans la phase aqueuse

Mélangeur à pâles : La série d'émulsions MPE6-HPMC1-6 montre à nouveau une légère séparation des phases un jour après fabrication (**Figure 64**). Cette séparation reste cependant moins importante que l'émulsion MPE6 formulée sans HPMC. L'émulsion **MPE6-HPMC5** est l'émulsion montrant la séparation de phase la plus faible 6 jours après fabrication. Cette dernière est donc sélectionnée pour les futures expériences.

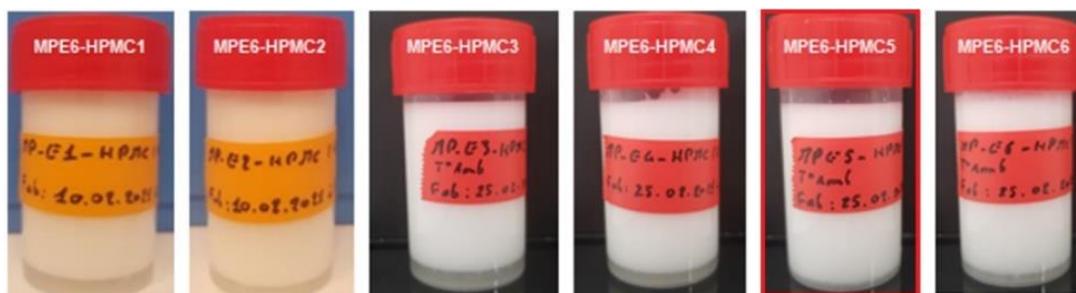


Figure 64 : Aspect macroscopique des émulsions MPE6-HPMC1-6 six jours post fabrication.

Seringues connectées : Aucune des émulsions SE6-HPMC1 – SE6-HPMC6 n'a mis en évidence une séparation de phases au bout de 24 heures. Ces dernières sont restées homogènes plusieurs jours après fabrication. Chacune des émulsions observées en microscopie optique directement après leur fabrication a permis de mettre en évidence la présence de globules lipidiques bien que difficilement observables.

❖ Tests de stabilité par centrifugation des émulsions formulées avec l'HPMC

Les séries d'émulsions formulées avec de l'HPMC ont été centrifugées avec une force de 2600 g pendant 10 min. Toutes les émulsions fabriquées avec le mélangeur à pâles montrent une séparation de leurs phases, nettement visible par comparaison aux émulsions fabriquées avec les seringues. Ces dernières laissent seulement apparaître une phase inférieure plus claire et en proportion moins importante (**Figure 65**).

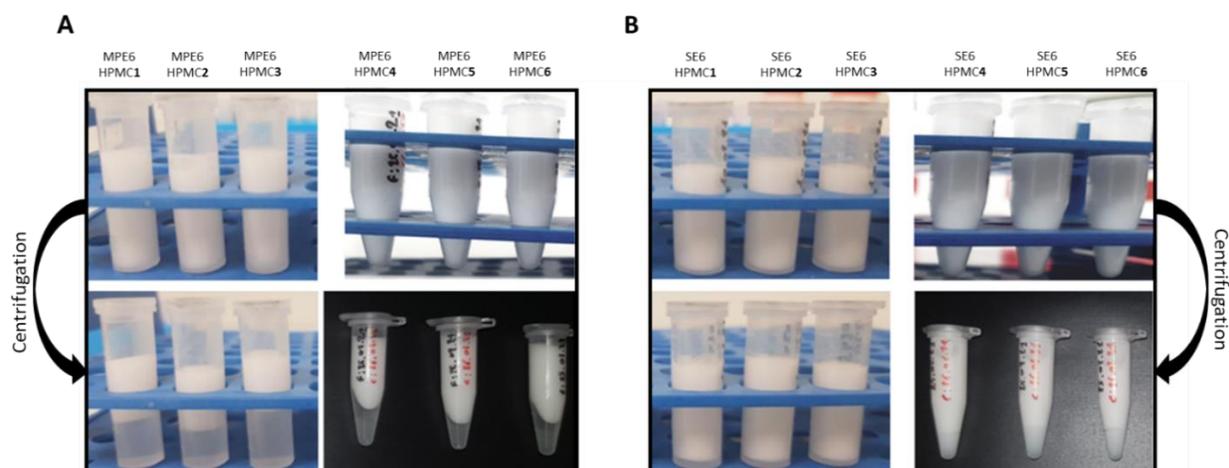


Figure 65 : A – Aspect macroscopique à J+1 des émulsions MPE6-HPMC1-6 (de gauche à droite) avant et après centrifugation. B – Aspect macroscopique à J+1 des émulsions SE6-HPMC1-6 (de gauche à droite) avant et après centrifugation.

3.1.2 Étude de l'impact du tensioactif et de la température de fabrication

❖ Étude sur la formulation de MPE6-HPMC5

L'émulsion formulée à température ambiante sans tensioactif est celle montrant la meilleure stabilité (**Tableau VII**). En présence de tensioactif, les différentes températures de formulation n'ont pas montré de différences significatives entre les émulsions obtenues.

	AVEC TENSIOACTIF (Ratio $E \div H = 1,5$)	SANS TENSIOACTIF (Ratio $E \div H = 1,0$)
BAIN-MARIE : 37 °C	Émulsion similaire à MPE6-HPMC5 Séparation de phases à J+1	Pas de dispersion possible de la phase aqueuse dans la phase huileuse
TEMPÉRATURE AMBIANTE : 21 °C	Émulsion similaire à MPE6-HPMC5 Séparation de phases à J+1	Aspect crémeux blanc opaque Très bonne stabilité (pas de séparation de phases observée jusqu'à plusieurs semaines)

Tableau VII : Étude de l'impact du tensioactif et de la température de fabrication sur la stabilité de MPE6-HPMC5

L'ÉMULSIONS **MPE6-HPMC5** FORMULÉE **SANS** TENSIOACTIF À TEMPÉRATURE AMBIANTE EST SELECTIONNÉE ET CORRESPOND À L'EMULSION « **MPE** ».

❖ Étude sur la formulation de SE6-HPMC5

Pour des raisons pratiques, les formulations au bain-marie ne sont pas applicables avec la méthode de fabrication utilisant des seringues connectées. A température ambiante (21 °C), l'émulsion contenant le tensioactif a permis de reproduire le résultat déjà obtenu précédemment en 3.1.1.

Concernant l'émulsion formulée à température ambiante sans tensioactif, cette formulation n'a pas permis d'obtenir une dispersion de la phase huileuse dans la phase aqueuse.

L'ÉMULSION SE6-HPMC5 FORMULÉE AVEC TENSIOACTIF À TEMPÉRATURE AMBIANTE EST SÉLECTIONNÉE ET CORRESPOND À L'ÉMULSION « SE »

❖ Tests de stabilité par centrifugation

Après centrifugation à environ 2600 g pendant 10 min, les émulsions précédemment sélectionnées (SE et MPE) ne montrent pas de séparation de phases. Étonnement, la phase supérieure prélevée à partir de l'émulsion MPE6-HPMC5 formulée sans Tween 20 au bain-marie à 37°C est restée homogène. Toutes les autres émulsions formulées montrent une séparation de leurs phases (**Figure 66**).

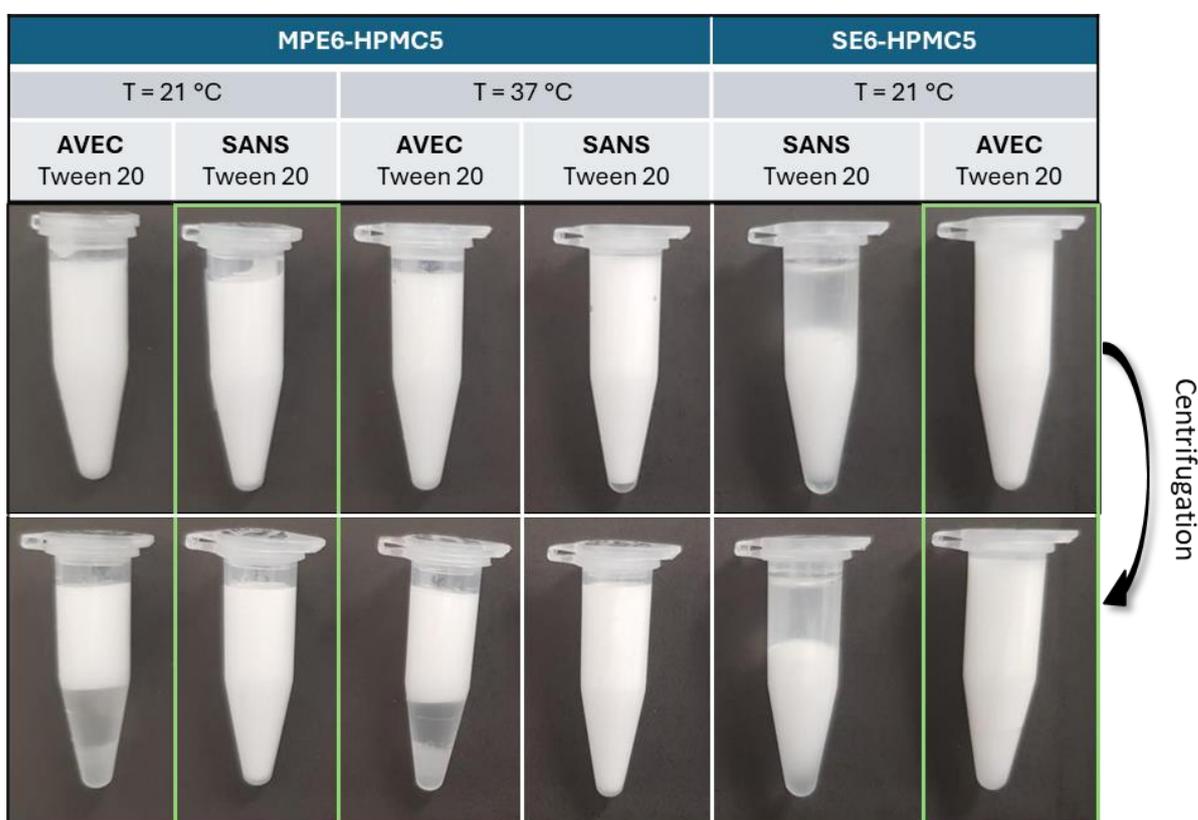


Figure 66 : Test de stabilité par centrifugation des émulsions MPE6-HPMC5 et SE6-HPMC5 formulées selon différentes températures avec ou sans tensioactif.

3.1.3 Observation au microscope numérique des émulsions SE et MPE

L'observation au microscope numérique de l'émulsion MPE met en évidence la présence de globules lipidiques avec une prédominance du nombre des globules de petite taille (**Figure 67**). Concernant l'émulsion SE, son observation au microscope met en évidence la présence de rares globules lipidiques de grande taille par rapport à d'autres globules de très petite taille, en nombre important, mais difficilement observables du fait de la limite de résolution de l'appareil.

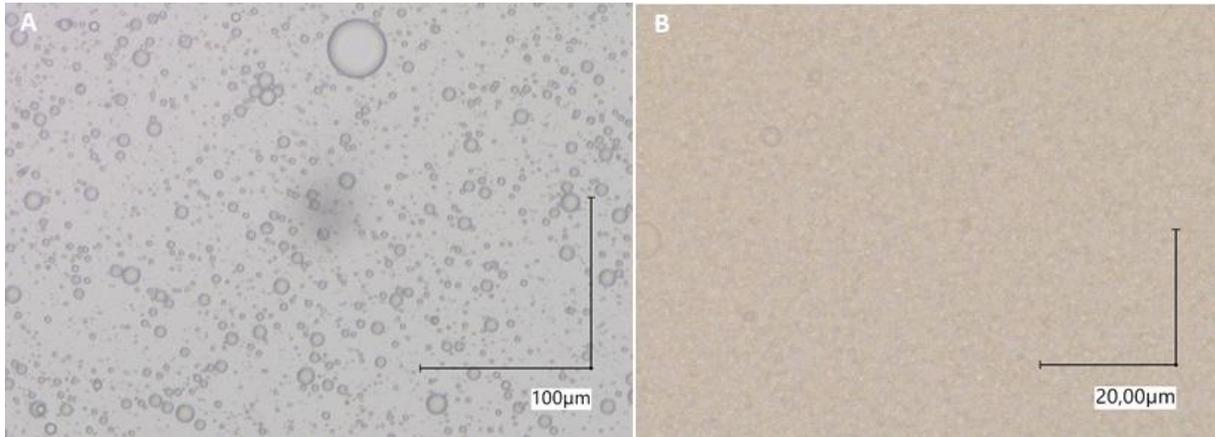


Figure 67 : Observation au microscope numérique des émulsions MPE et SE après dilution au 1/10^{ème} dans de l'eau purifiée. Émulsion MPE à gauche (A) et émulsion SE à droite (B).

3.1.4 Encapsulation du Nile Red dans les émulsions SE et MPE

Les émulsions SE et MPE ont pu être formulées à partir de la solution mère de Miglyol colorée au Nile Red (**Figure 68**). Leur texture est identique à leur homologue ne contenant pas de Nile Red. Les globules lipidiques de l'émulsion MPE observés au macroscopie à fluorescence sont nettement visibles et le Nile Red ne semble pas diffuser vers la phase aqueuse. Les globules lipidiques de l'émulsion SE sont plus difficilement observables. La résolution de l'appareil ne permet pas de les distinguer avec précision. Quelques rares globules lipidiques de grandes tailles restent visibles.

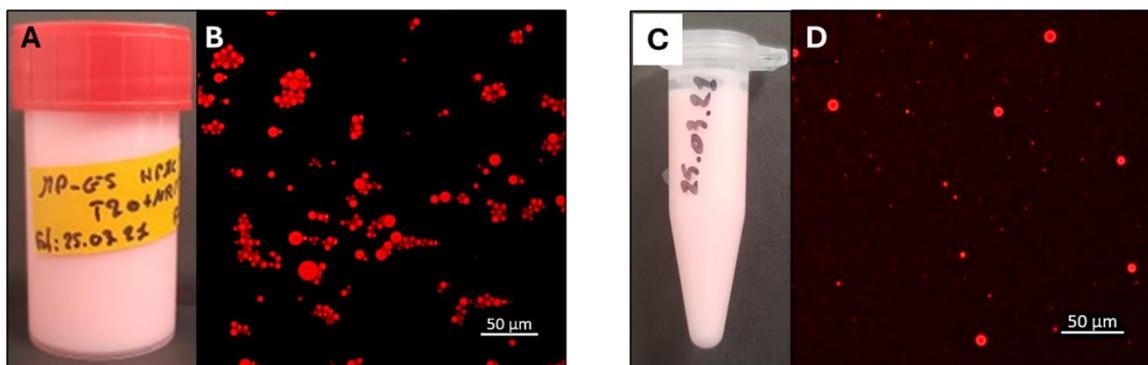


Figure 68 : Coloration au Nile Red des émulsions SE et MPE. Aspect macroscopique de l'émulsion MPE (A) et observation de ses globules lipidiques au macroscopie à fluorescence à J0 (B). Aspect macroscopique de l'émulsion SE (C) et observation de ses globules lipidiques au macroscopie à fluorescence à J0 (D).

3.1.5 Mesure de la taille des globules des émulsions SE et MPE

Les données obtenues ont permis de tracer graphiquement la distribution en densité (%) du volume occupé par les globules lipidiques ainsi que la distribution de leur nombre en fonction de leur taille (**Figure 69**). D'après les données brutes obtenues, la taille des globules lipidiques de l'émulsion MPE est globalement comprise entre 0,46 et 46 μm tandis que pour l'émulsion SE, leur taille est comprise entre 0,14 et 1,13 μm .

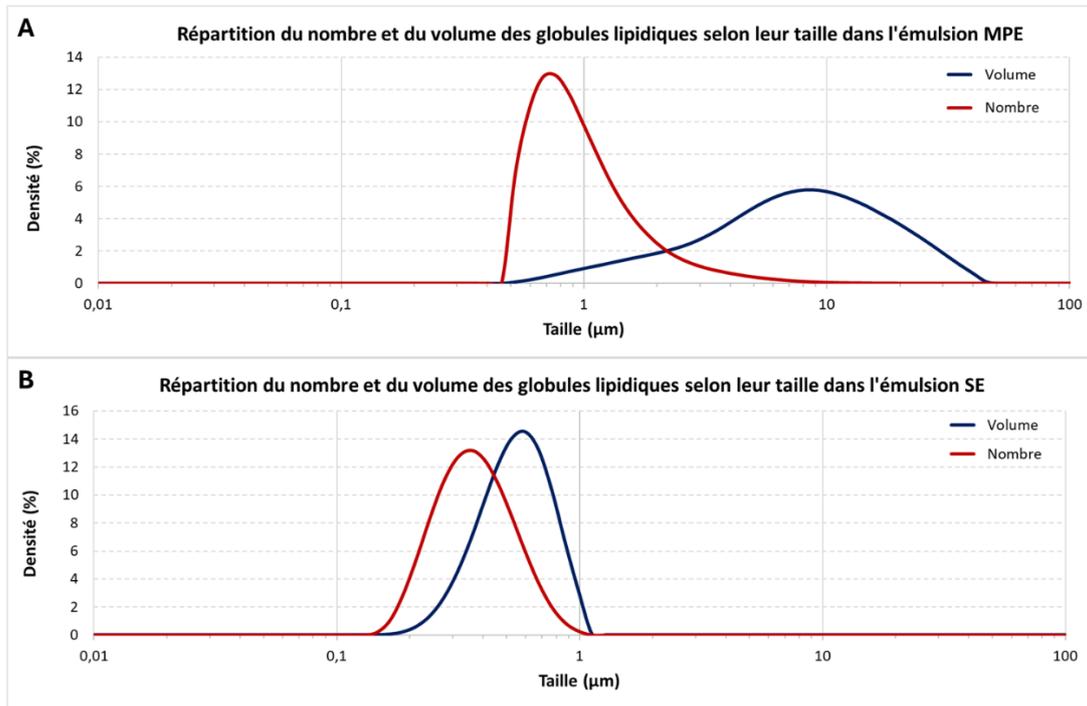


Figure 69 : Graphiques de distribution en densité du volume et du nombre des globules lipidiques de l'émulsion MPE (A) et SE (B)

3.1.6 Formulation de l'émulsion SE6-HPMC5 avec le Poloxamère 188

L'émulsion SE6-HPMC5 formulée à l'aide du Poloxamère 188 montre des globule lipidiques de taille plus importante (**Figure 70**) comparée à la formulation contenant le tween 20 (**Figure 67**). Leur observation au microscope numérique est nettement améliorée. Le test de stabilité par centrifugation à 2600 g pendant 10 min ne montre pas de séparation de phases.

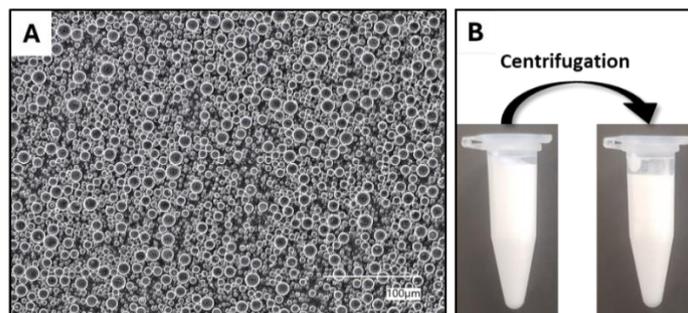


Figure 70 : Observation au microscope numérique et test de stabilité de l'émulsion SE6-HPMC5 formulée avec le Poloxamère 188. A – Image en microscopie optique obtenue après traitement en haute résolution (HDR). B – Test de stabilité par centrifugation.

3.2 Fabrication et caractérisation des hydrogels H-MPE et H-SE

3.2.1 Observations macroscopiques et microscopique

❖ Aspect macroscopique à l'œil nu et en microscopie optique

Les hydrogels ont été conservés à l'intérieur de leur seringue munie d'un bouchon et sont restés stables, sans changement d'apparence pendant plusieurs jours. Les images obtenues au microscope numérique (**Figure 71**) mettent en évidence la présence des globules lipidiques dans l'hydrogel H-MPE (initialement présents dans l'émulsions MPE). Concernant l'hydrogel H-SE, les globules lipidiques sont plus difficilement observables, à nouveau à cause de leur taille proche voir inférieure à la limite de résolution du microscope.

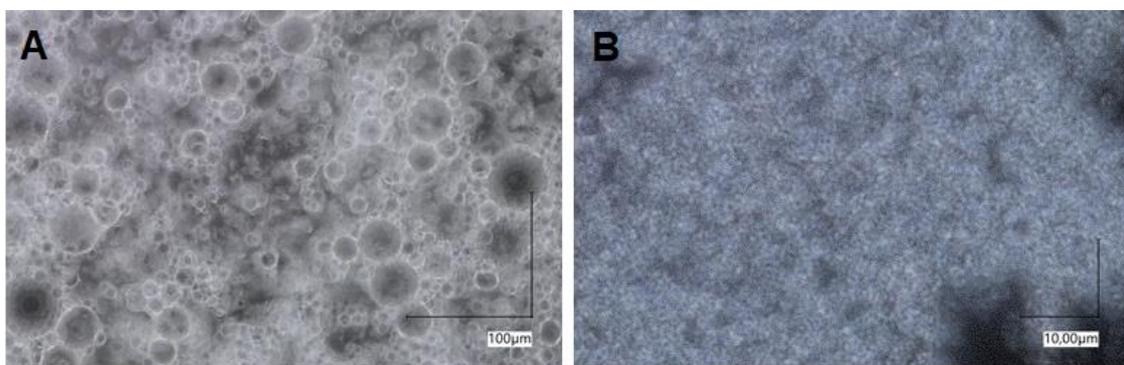


Figure 71 : Observation au microscope numérique des hydrogels H-MPE (A) et H-SE (B) après traitement des images en haute résolution (HDR)

❖ Macroscopie à fluorescence

Les globules lipidiques apparaissent clairement après observation en macroscopie à fluorescence dans l'hydrogel H-MPE (**Figure 72**). Les globules semblent être contenus dans une seconde phase (diffuse) en arrière-plan, également colorée au Nile Red. Concernant l'hydrogel H-SE, les globules sont nombreux et de taille largement inférieure. Ces derniers sont à nouveau difficilement observables, quelques rares globules de taille plus importante peuvent être distingués.

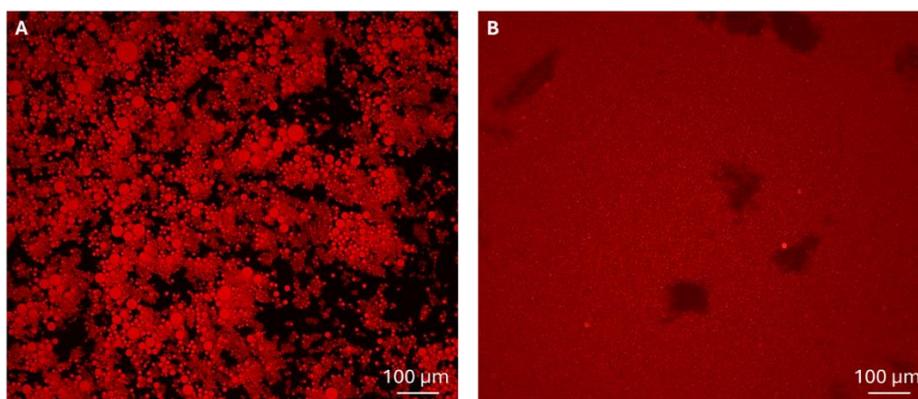


Figure 72 : Observation en macroscopie à fluorescence de l'hydrogel H-MPE (A) et H-SE (B) fabriqués respectivement à partir des émulsions MPE et SE encapsulant le Nile Red.

3.2.2 Observation en CryoMEB

L'analyse des hydrogels H-MPE et H-SE en CryoMEB permet d'observer avec précision les globules lipidiques, apparaissant en gris clair et en forme de sphères sur les images (**Figure 73**). L'observation du relief est permise par les électrons secondaires, sensibles aux variations de surface. Il est également possible d'observer le réseau poreux formé par l'HA réticulé, emprisonnant les globules lipidiques sous forme d'amas (H-SE).

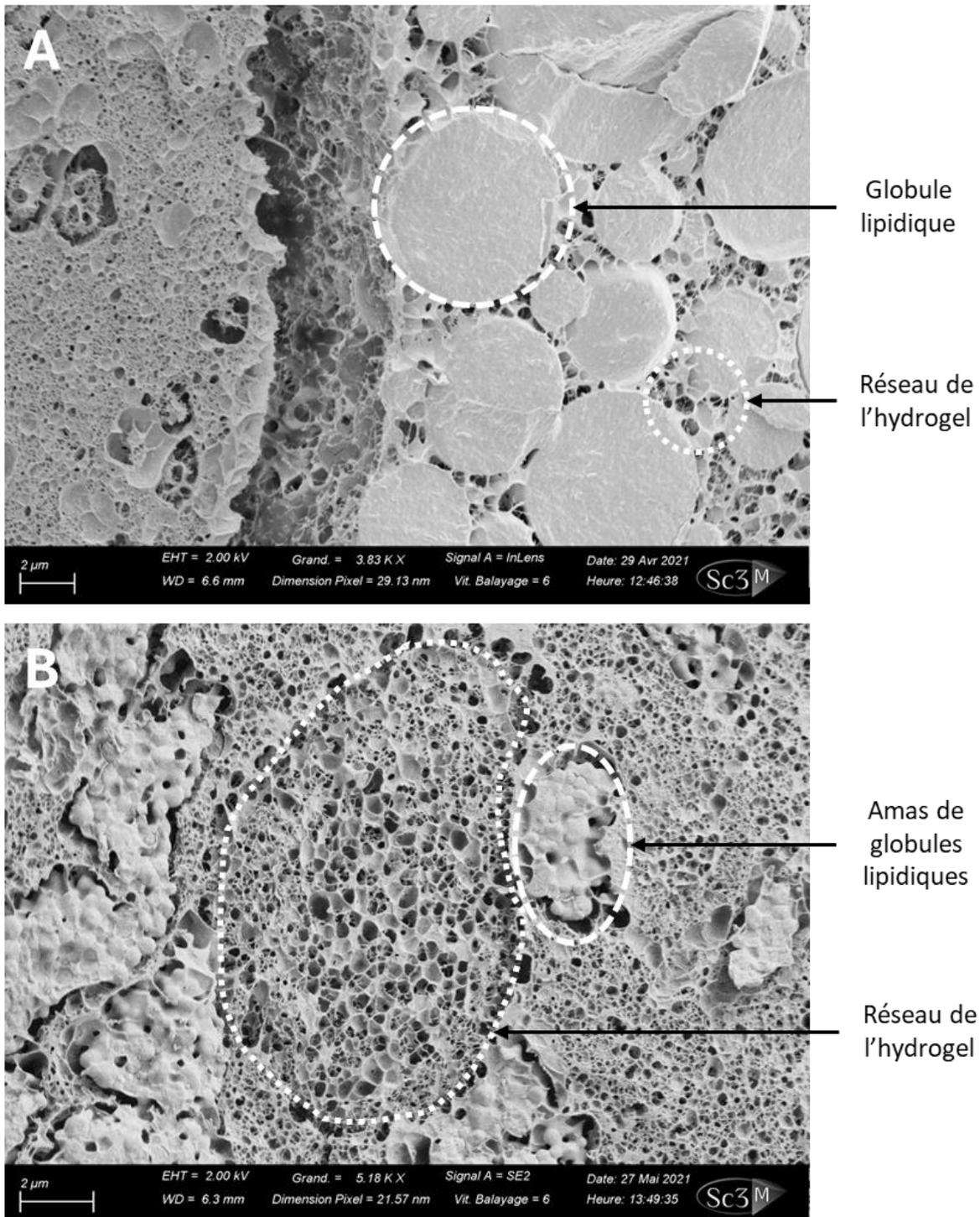


Figure 73 : Observation en CryoMEB des hydrogels H-MPE (A) et H-SE (B) mettant en évidence la structure des globules lipidiques au sein du réseau formé par l'hydrogel d'acide hyaluronique réticulé.

3.2.3 Mesures rhéologiques

Le point de gel de l'hydrogel H-MPE est déterminé graphiquement à 1 min 30 s tandis que celui de l'hydrogel H-SE a été déterminé à environ 2 min 10 s (**Figure 74**). La courbe de fréquence à 1,8 Hz de l'hydrogel H-MPE semble aberrante en début d'analyse par rapport à l'allure des autres courbes. Concernant la texture des gels, leur aspect avant analyse était liquide/visqueux tandis qu'en fin d'analyse, les hydrogels sont devenus fermes et élastiques.

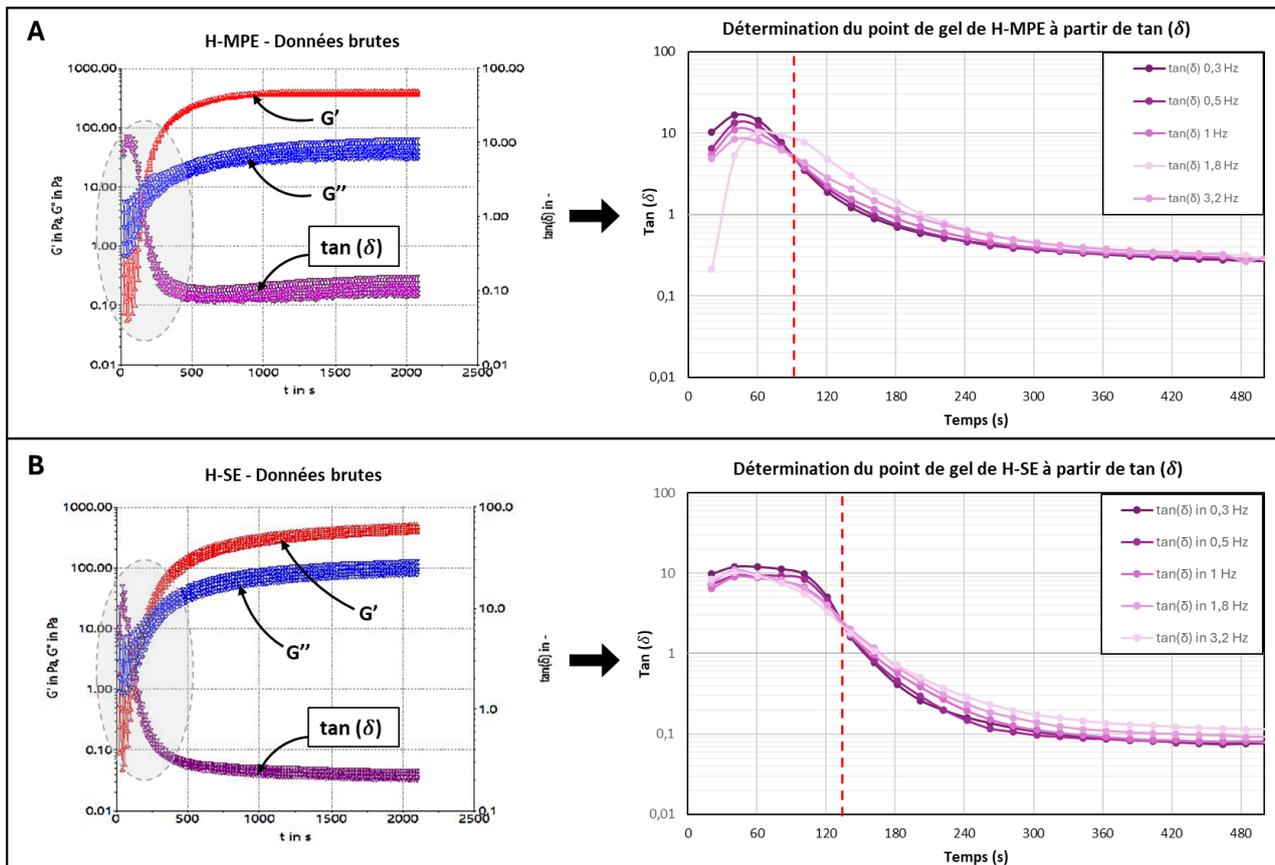


Figure 74 : Données brutes (G' , G'' et \tan) et analyse de $\tan(\delta)$ selon la fréquence pour la détermination du point de gel des hydrogels H-MPE (A) et H-SE (B).

3.2.4 Mesures d'injectabilité sur gels réticulés

À l'aide d'une aiguille de 18G, les forces moyennes d'injection calculées à partir des valeurs de la phase plateau (entre 4 et 11s) étaient de 39,5 N et 13,8 N pour les hydrogels H-MPE et H-SE respectivement. Avec une aiguille de 23G, les forces moyennes calculées pour l'hydrogel H-MPE et H-SE sont respectivement de 28,2 N et 23,3 N. Un écart de force important est donc observé entre les gels H-MPE et H-SE avec une aiguille de 18G. Globalement, l'hydrogel H-SE nécessite une force d'injection plus faible que l'hydrogel H-MPE sans dépendre du type d'aiguille (**Figure 75**).

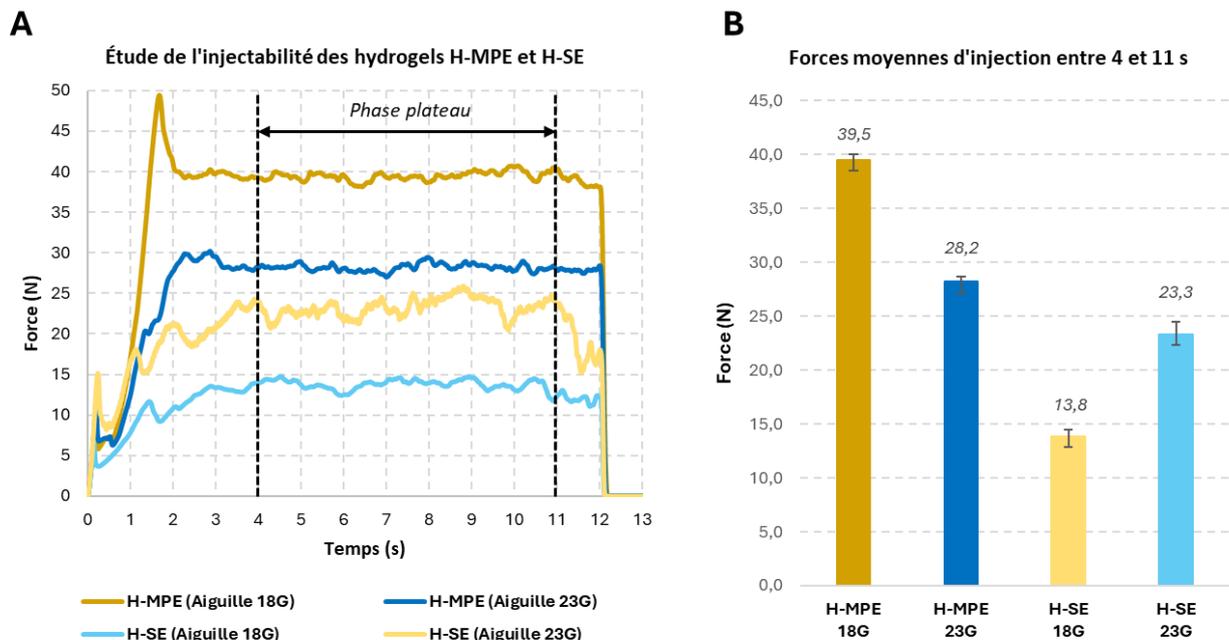


Figure 75 : Étude de l'injectabilité des hydrogels H-MPE et H-SE au travers d'aiguille de 18G ou 23G – A : Graphique des données brutes avec la force d'injection en fonction du temps. B : Graphique des forces moyennes calculées à partir de la phase plateau.

4 Discussion

4.1 Émulsions

4.1.1 Formulation des séries d'émulsion

❖ Formulation d'une série d'émulsions MPE1 à MPE6 et formulation de SE6

Les émulsions MPE1 à MPE6 ne sont pas restées stables plus de 24 heures. L'émulsion MPE6 est l'émulsion qui a montré la meilleure stabilité avec la séparation de phases la moins importante. Cette amélioration de stabilité de MPE6 peut être liée au volume équivalent de Miglyol incorporé par rapport au volume d'eau. Il est important de noter que l'émulsion MPE6 reste une émulsion de type H/E puisque le volume de phase aqueuse comprend également le tensioactif, en quantité non négligeable ici. Le volume de phase huileuse reste ainsi inférieur au volume total de phase aqueuse.

❖ Ajout de l'HPMC dans la phase aqueuse

L'ajout d'HPMC dans les émulsions fabriquées avec le mélangeur à pâles a permis d'obtenir des émulsions légèrement plus stables que les émulsions MPE6. Ce résultat est probablement lié à l'épaississement des émulsions permis par l'HPMC en complément de son pouvoir tensioactif. Cependant, il existe une différence de stabilité importante entre les émulsions fabriquées avec le

mélangeur à pâles et les seringues, en faveur des émulsions de type « SE ». Ce résultat peut être expliqué par la différence de la taille des globules lipidiques (d'après les observations en microscopie optique) obtenus entre ces deux méthodes, plus petite dans les émulsions « SE ». La loi de Stokes permet en effet d'expliquer mathématiquement que plus une particule (globule) est petite, plus sa vitesse de sédimentation sera faible :

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

Avec :

- v : vitesse limite de sédimentation ou crémage (mm.s^{-1})
- r : rayon de la sphère, particule ou globule (mm.s^{-2})
- g : accélération de la pesanteur (mm.s^{-2})
- $\Delta(\rho) = \rho_p - \rho_f$: différence de masse volumique entre la sphère et le fluide (kg.m^{-3})
- μ : viscosité dynamique du fluide

4.1.2 Étude de l'impact du tensioactif et de la température de fabrication

De manière surprenante, l'émulsion MPE6-HPMC5 fabriquée au mélangeur à pâles sans tween 20 (nommée **MPE**) a permis d'obtenir un produit très stable avec un aspect blanc crémeux. Les autres méthodes de production n'ont pas permis d'améliorer les résultats déjà obtenus ou n'ont pas permis de formuler une émulsion.

Concernant l'émulsion SE6-HPMC5 fabriquée sans tensioactif, contrairement à l'émulsion MPE, la suppression du tensioactif n'a pas permis d'obtenir un produit stable. Cette différence est probablement liée aux méthodes de mélanges très différentes. En effet, les temps de mélange ne sont pas les mêmes, le mélange avec les seringues est effectué manuellement tandis que le mélangeur à pôle est un mélange mécanique (automatisé), les forces de cisaillements appliquées sont également différentes. De plus, il existe un autre facteur concernant les proportions de phase aqueuse et huileuse prélevées entre ces deux techniques. Des volumes sont prélevés dans les seringues tandis que des masses sont pesées pour l'émulsion MPE. Bien que le ratio E/H de 1,5 en volume ou en masse soit conservé, les proportions ne sont pas exactement les mêmes si l'on tient compte des masses volumiques des composants.

En somme, à l'issu de cette étude, l'émulsions **MPE6-HPMC5 formulée sans tensioactif à température ambiante** et l'émulsion **SE6-HPMC5 formulée avec tensioactif à température ambiante** présentent la meilleure stabilité et sont sélectionnées. En effet, ces dernière n'ont pas montré de séparation de phases après avoir subis un test de centrifugation à 2600 g pendant 10 min. Ces émulsions, nommées **MPE** et **SE** sont utilisées pour la poursuite des tests.

4.1.3 Encapsulation du Nile Red dans les émulsion SE et MPE

La coloration de la phase huileuse par la Nile Red a permis de prouver la capacité des émulsions à encapsuler une molécule lipophile sans observer un phénomène de diffusion depuis la phase huileuse vers la phase aqueuse. Cependant, l'observation des globules lipidiques de l'émulsion SE est rendu difficile à cause de la limite de résolution de l'appareil, laissant apparaître un bruit de fond sur les images. Néanmoins, la taille inférieure des globules de l'émulsion SE par rapport à l'émulsion MPE peut être confirmée.

4.1.4 Mesure de la taille des globules des émulsions SE et MPE

Cette analyse a permis de mettre en évidence deux types de population de globules lipidiques dans chacune des émulsions MPE et SE. Il existe ainsi une première population, de petite taille et très abondante puis une deuxième population de grande taille et moins abondante mais occupant un volume important. Cette différence de population est très marquée dans l'émulsion MPE comparée à l'émulsion SE où la distribution du volume est proche de la distribution en nombre. Cette proximité des distributions entre le volume et le nombre de globules selon leur taille dans l'émulsion SE laisse supposer une meilleure homogénéité par rapport à l'émulsion MPE. Cela laisse également supposer une meilleure stabilité de l'émulsion SE.

L'ordre de grandeur de la taille des globules lipidiques de l'émulsion SE est inférieur voir légèrement supérieur à 1 μm tandis que pour l'émulsion MPE, la taille des globules peut varier de quelques dizaines de μm . Les résultats sont cohérents avec les observations réalisées en microscopie optique. Cependant, par comparaison avec les images observées en macroscopie à fluorescence, les résultats obtenus sont moins cohérents. Pour chaque émulsion, les globules lipidiques semblent de taille plus grande. Il est possible que le Nile Red impact la taille des globules lipidiques en fonction de sa concentration (236). Néanmoins, la taille des globules de l'émulsions SE reste inférieure à celle des globules de l'émulsion MPE.

4.1.5 Étude d'une alternative au tween 20 : Poloxamère 188

Le tween 20 peut parfois présenter des problèmes de stabilisation dans certains produits (234). Ainsi, dans le but d'améliorer la stabilité des émulsions et la formation des globules lipidiques via l'utilisation de seringues connectées, le Poloxamère 188 a été étudié comme alternative. D'après les images obtenues au microscope numérique, les globules sont aisément visibles et de taille plus importante que précédemment. Après centrifugation, l'émulsion est restée homogène montrant ainsi une bonne stabilité. Ce tensioactif présente donc un certain potentiel pour la formulation d'émulsion à base d'HPMC et de Miglyol. De plus, il s'agit d'un produit biocompatible et approuvé par la FDA (233).

4.2 Hydrogels

4.2.1 Observations en microscopie optique et macroscopie à fluorescence

❖ Microscopie optique

L'intégrité des globules lipidiques semble être préservée après fabrication de l'hydrogel H-MPE. Concernant l'hydrogel H-SE, les globules sont difficilement observables car leur taille est proche voire inférieure à 1 μm et ne permet pas leur observation avec précision. Afin de confirmer leur présence, des études complémentaires en macroscopie à fluorescence et en CryoMEB ont été réalisées.

❖ Macroscopie à fluorescence

Les globules lipidiques de l'hydrogel H-MPE sont nettement visibles et semblent contenus à l'intérieur d'une seconde phase colorée au Nile Red. D'après les mesures obtenues en granulométrie laser, cette seconde phase en arrière-plan peut correspondre aux globules de petite taille en nombre important. Pour rappel, les hydrogels ne sont pas observés après dispersion dans l'eau, la densité des globules lipidiques est par conséquent plus importante comparé aux images obtenues sur les émulsions. Des zones sombres sont également observables, ces dernières pourraient correspondre des zones l'hydrogel formé par l'HA-si réticulé ne contenant pas globules. Concernant l'hydrogel H-SE, les images obtenues n'ont pas permis de mettre clairement en évidence la présence des globules lipidiques. Les images sont saturées par la fluorescence du Nile Red contenu dans les globules lipidique en nombre élevé et de taille inférieure ou proche de la limite de résolution du microscope.

4.2.2 Observation en CryoMEB

Sur l'image correspondant à l'hydrogel H-SE (**Figure 73 - B**), les globules lipidiques semblent regroupés dans des amas en « grappe de raisin ». Cette structure étant comprise au sein d'une matrice hydrophile formée par du HA-Si, il est possible qu'il existe une affinité entre les globules lipidiques de nature lipophile, permettant leur regroupement. Le produit obtenu correspondrait ainsi à une dispersion de l'émulsion au sein de l'hydrogel d'HA-Si avec un regroupement en amas des globules de l'émulsion dispersée. Finalement, ces observations permettent de confirmer l'intégrité et la présence des globules lipidiques au sein de l'hydrogel H-SE.

Concernant l'hydrogel H-MPE et avec un grossissement moins important, le regroupement des globules lipidiques au sein de plusieurs zones a également pu être observé. L'image reportée ici (**Figure 73 - A**) permet également de mettre en évidence la présence du réseau d'HA-Si réticulé entre les globules lipidiques, probablement enchevêtré avec les polymères d'HPMC de la phase aqueuse des émulsions.

4.2.3 Mesures rhéologiques

Les deux hydrogels ne montrent pas de différence significative de leur temps de gélification qui est de l'ordre de quelques minutes. De plus, les points de gel mesurés entre les échantillons peuvent varier de quelques secondes selon le temps de préparation nécessaire avant injection des sur le plan Peltier du rhéomètre. Une différence de 40 secondes entre les deux points de gel déterminés graphiquement est donc considérée comme non significative. Les mesures effectuées ici étaient à titre exploratoire, une méthode précise chronométrant chaque étape et mesurant plusieurs échantillons par type de gel permettrait de calculer une moyenne avec plus de précision dans le cas où un temps de gélification précis serait recherché.

Le principal objectif de cette expérience était de démontrer que la transition sol-gel après diminution du pH du HA-Si pouvait avoir lieu lorsque ce dernier est mélangé avec une émulsion. Les mesures obtenues montrent ainsi une transition relativement rapide, de l'ordre de quelques minutes pouvant être adaptée à une application clinique. En effet, il serait envisageable de formuler l'hydrogel extemporanément en ajoutant une solution tampon à un mélange hydrogel/émulsion initiant la réticulation du HA-Si. Le gel en cours de réticulation reste ainsi facilement injectable (en comparaison à un gel solide) et poursuit sa réticulation une fois injecté. La réticulation complète du gel au bout de quelques minutes permettrait ensuite son maintien en place au site d'injection.

4.2.4 Mesure d'injectabilité sur gels réticulés

Globalement, l'hydrogel H-MPE nécessite une force d'injection plus élevée que l'hydrogel H-SE. Cela montre qu'il existe un impact dépendant du type d'émulsion (« MPE » ou « SE ») ajouté dans le HA-Si vis-à-vis de son injectabilité.

En fonction du type d'aiguille utilisée, la force d'injection était variable. Avec l'hydrogel H-MPE et une aiguille de 23G (de diamètre interne inférieur à une aiguille de 18G) la force d'injection nécessaire était plus élevée qu'avec une aiguille de 18G. L'effet inverse a été observé avec l'hydrogel H-SE. L'influence de la taille de l'aiguille est donc difficilement interprétable dans cette expérience. A nouveau les mesures sont réalisées ici sont à titre exploratoire et ont pour but de démontrer que la force d'injection n'excède pas 50 N. Cette limite correspond à la force maximale d'injection manuelle généralement reportée (228). Des analyses complémentaires peuvent être réalisées dans le cas où une force d'injection précise serait recherchée.

Bien que les résultats obtenus ne permettent pas de démontrer qu'un calibre d'aiguille plus important nécessite une force d'injection plus faible, les forces mesurées restent inférieure à 50 N et ce, sur des gels totalement réticulés. De ce fait, les hydrogels fabriqués sont compatibles à une application en chirurgie dentaire où des aiguilles de 18G ou 23G peuvent être utilisées.

5 Conclusion

L'émulsion « MPE », fabriquée à température ambiante à l'aide d'un mélangeur à pâles, a pu être formulée avec une phase aqueuse contenant uniquement de l'HPMC concentrée à 2,5 % (m/v) et une phase huileuse contenant du Miglyol 812. La suppression du tensioactif a permis d'obtenir un produit très stable avec cette méthode tandis que l'émulsion SE avec la méthode de mélange par seringues conserve le tensioactif dans sa formule afin d'assurer sa stabilité.

Les analyses par granulométrie laser, microscopie optique et macroscopie à fluorescence de ces deux émulsions ont permis de mettre en évidence une différence de taille importante des globules lipidiques. Les mélanges réalisés à l'aide de seringues permettent d'obtenir des globules lipidiques de petite taille, inférieure ou légèrement supérieure à 1 μ m. Avec un mélangeur à pâles, les globules lipidiques ont une taille plus importante variant de plusieurs dizaines de μ m.

Les hydrogels H-MPE et H-SE, à base d'HA-Si, ont pu être synthétisés en intégrant respectivement les émulsions MPE et SE. Les observations réalisées en microscopie optique, macroscopie à fluorescence et CryoMEB ont démontré l'intégrité des globules lipidiques au sein des hydrogels. La CryoMEB a également permis d'observer en détail la structure des hydrogels en mettant en évidence la formation d'un réseau de polymères contenant les globules lipidiques.

La caractérisation de ces hydrogels par mesures rhéologiques permet d'envisager une future application clinique. En effet, leur temps de réticulation est suffisamment long pour être injecté facilement lorsque le gel est encore visqueux ($G' < G''$) et permet d'obtenir un gel élastique ($G' > G''$) une fois injecté. De plus, les mesures d'injectabilité ont montré que des gels totalement réticulés restent injectables au travers d'aiguilles de 18G ou 23G.

Cette étude sur la formulation d'un nouveau système de délivrance à base d'acide hyaluronique silanisé est encourageante et fera l'objet d'études complémentaires appliquées à l'encapsulation de la LXA4. L'utilisation du Poloxamère 188 comme alternative au Tween 20 peut également être envisagée pour la formulation de l'émulsion SE et son intégration dans un hydrogel.

6 Poursuite du projet par l'équipe RMES

Le projet précédemment mené a été poursuivi par l'équipe RMES, les travaux réalisés ont pu être publiés très récemment (237). L'objectif était d'étudier la capacité des hydrogels à transporter et protéger la LXA4 et d'étudier ensuite leurs effets sur des macrophages polarisés M1 (phénotype pro-inflammatoire) et M2 (phénotype anti-inflammatoire). Une application clinique de ces hydrogels pour le traitement de l'inflammation serait ensuite envisagée.

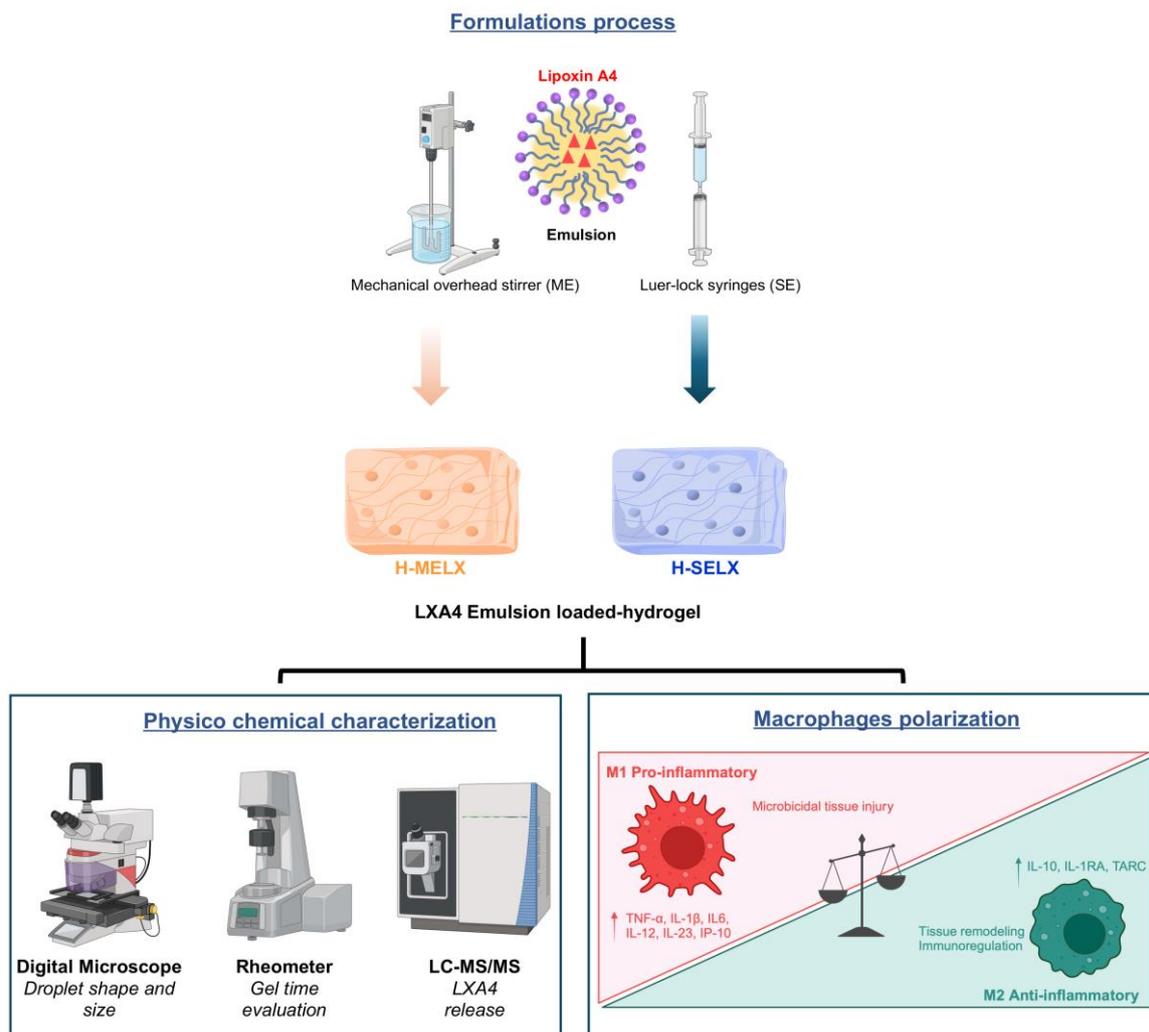


Figure 76 : Résumé graphique

6.1 Emulsions ME et SE

La formulation de l'émulsion ME a été reprise tandis que l'émulsion SE a été formulée avec le Poloxamère 188 pour remplacer le Tween20. Les proportions des volumes de phases aqueuse et huileuse sont également modifiées avec 80 % de solution α d'HPMC (2,5 % m/m), 10 % de tensioactif et 10 % de Miglyol.

Différents tests et analyses ont été menés sur ces émulsions dont la **microscopie optique** à l'aide du microscope numérique, également utilisé ici pour mesurer la taille des globules lipidiques. La taille des globules était de l'ordre de quelques micromètres avec une taille supérieure dans l'émulsion SE par rapport à l'émulsion ME. Ces mesures ont été réalisées pendant plusieurs jours et ont permis d'affirmer une stabilité des émulsions d'au moins une semaine, sans observer de variation significative de la taille des globules.

Le rendement d'encapsulation de la LXA4 a été mesuré par LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) et exprimé en pourcentage de LXA4 encapsulée par rapport à la quantité totale de LXA4. Ce rendement était de 26 % pour ME et de 12 % pour SE.

6.2 Hydrogels H-MELX et H-SELX

Les hydrogels contenant la LXA4 sont à nouveau caractérisés par le **point de gel** à l'aide de mesures rhéologiques. Le point de gel mesuré à partir de $\tan(\delta)$ pour l'hydrogel H-MELX est similaire à celui obtenu précédemment (2 min) tandis que pour l'hydrogel H-SELX, le point de gel était de plusieurs minutes (6 min).

Une étude de la stabilité de la LXA4 en conditions acide ou basique a mis en évidence une dégradation plus importante qu'à pH physiologique. Cette étude permet ainsi de souligner l'intérêt de protéger la molécule au sein d'un hydrogel avec un pH proche de celui retrouvé physiologiquement. A la suite de cette étude de stabilité, une étude de la libération de la LXA4 a été réalisée à pH physiologique en présence de hyaluronidases. Une libération maximale de 74 % est mesurée au bout de 3 jours pour l'hydrogel H-MELX contre 28 % pour l'hydrogel H-SELX.

L'impact de ces hydrogels sur la polarisation des macrophages M0 ainsi que leur impact sur les macrophages pré-polarisés M1 et M2 a été étudié. Les macrophages M0 sont obtenus à partir de cellules de monocytes humain (THP-1). Les macrophages M1 (pro-inflammatoire) et M2 (anti-inflammatoire) sont ensuite obtenus à partir des macrophages M0 après leur culture en présence de LPS (Lipopolysaccharide) et IFN- γ (Interféron gamma) pour les macrophages M1 ou en présence d'IL-4 et IL-13 pour les macrophages M2. Des hydrogels ne contenant pas de LXA4 ont été fabriqués afin de contrôler les résultats obtenus après leur mise en contact avec les macrophages :

- **Macrophages M0 non-polarisés** : Après contact avec chaque type d'hydrogel, les macrophages M0 sont polarisés vers un phénotype pro-inflammatoire M1. Cependant, la quantité de cytokines pro-inflammatoires sécrétée par les macrophages en contact avec les

hydrogels H-MELX et H-SELX était inférieure à ceux en contact avec les hydrogels sans LXA4. l'hydrogel H-SELX induit moins fortement cette différenciation que l'hydrogel H-MELX avec en plus une augmentation de cytokines anti-inflammatoires telle que l'IL-10. Cela laisse supposer une différenciation des macrophages M1 vers un phénotype M2.

- **Macrophages M1 pro-inflammatoire** : Les hydrogels sans LXA4 ont montré une exacerbation du caractère pro-inflammatoire des macrophages tandis que les hydrogels H-MELX et H-SELX ont permis de le réduire.
- **Macrophages M2 anti-inflammatoire** : Aucune différences significatives n'est observées entre les hydrogels H-MELX et H-SELX. Les deux hydrogels permettent d'augmenter la sécrétion de cytokine anti-inflammatoires sans discerner de différence après comparaison avec les hydrogels ne contenant pas de LXA4.

Bien que la libération soit plus efficace avec l'hydrogel H-MELX, les études biologiques ont montré une meilleure réponse de l'hydrogel H-SELX exacerbent dans une moindre mesure le profil pro-inflammatoire des macrophages. Cette différence peut être liée au Poloxamère 188 contenu initialement dans l'émulsion SE, permettant de protéger davantage la LXA4 via ses propriétés antioxydantes (238).

6.3 Conclusion

De façon notable, cette étude a permis de formuler deux hydrogels encapsulant la LXA4 et sont capables d'assurer sa libération et de la protéger des conditions acides ou basiques pouvant être retrouvées dans différentes pathologies. La libération de la LXA4 peut en effet être assurée entre autres par la présence hyaluronidases présentes *in vivo*. Une réponse inflammatoire moins importante pour les hydrogels contenant la LXA4 par rapport aux hydrogels sans LXA4 prouve l'efficacité et l'intérêt de cette molécule dans la résolution de l'inflammation avec une meilleure efficacité pour l'hydrogel H-SELX. De plus, l'activité biologique des hydrogels et la libération de la LXA4 peuvent être optimisés en modifiant la taille des mailles par l'ajustement des concentrations, du poids moléculaire et du degré de réticulation du HA-Si. Une augmentation de l'efficacité d'encapsulation de la LXA4 dans les émulsions peut également être permise en réduisant la taille des globules lipidiques (239,240). De plus, une taille des globules de l'ordre du nanomètre peut faciliter la libération de LXA4 à partir des hydrogels, une approche alternative avec l'utilisation de nanoémulsions peut ainsi être envisagée.

CHAPITRE IV : FOCUS SUR LES MECANISMES DE DEGRADATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE

1 Dégradation enzymatique

1.1 La hyaluronidase

l'AH peut être dégradé *in vivo* par l'action de hyaluronidases (241). Chez l'homme, la majorité de l'AH présent dans le sang ou la lymphe est éliminé par endocytose via les récepteurs HARE (Hyaluronan Receptor for Endocytosis), présents dans les cellules sinusoidales de l'endothélium du foie (242,243) et des nodules lymphatiques (243) (**Figure 77**). Dans l'os ou le cartilage, l'AH étant non circulant, son internalisation fait intervenir le CD44 (39) pour être ensuite dégradé via l'action de hyaluronidases.

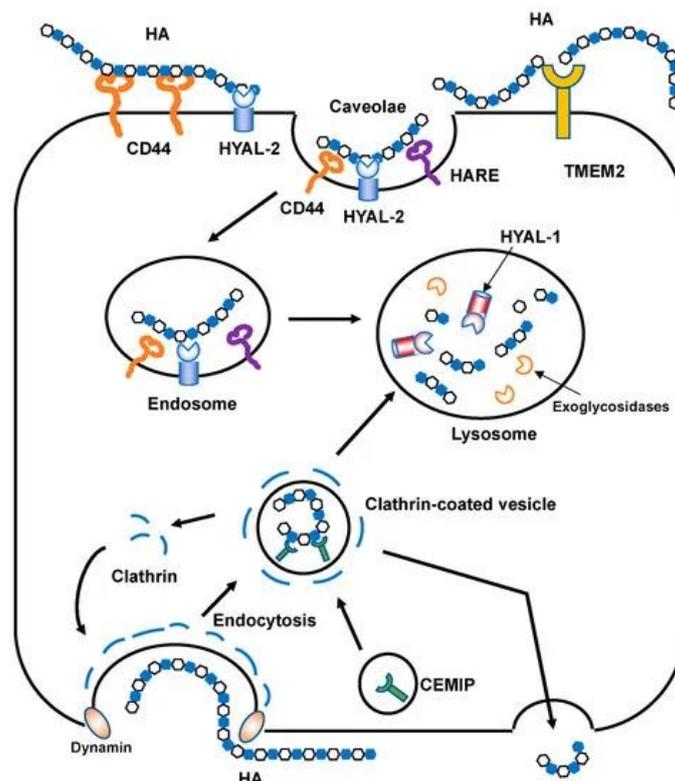


Figure 77 : Endocytose de l'acide hyaluronique par le récepteur HARE permettant sa dégradation par la hyaluronidase de type 1 (HYAL-1) au sein des lysosomes (242).

Il existe plusieurs types de hyaluronidases chez les procaryotes et les eucaryotes (**Figure 78**) avec des mécanismes de dégradation très différents. Le nom attribué à ces enzymes est en réalité inapproprié puisqu'elles sont à la fois capables de dégrader l'AH, les chondroïtines et les chondroïtines sulfates. Seule une classe de hyaluronidase procaryote retrouvée chez *Streptomyces Hyalurolyticus* est spécifique de l'AH (241).

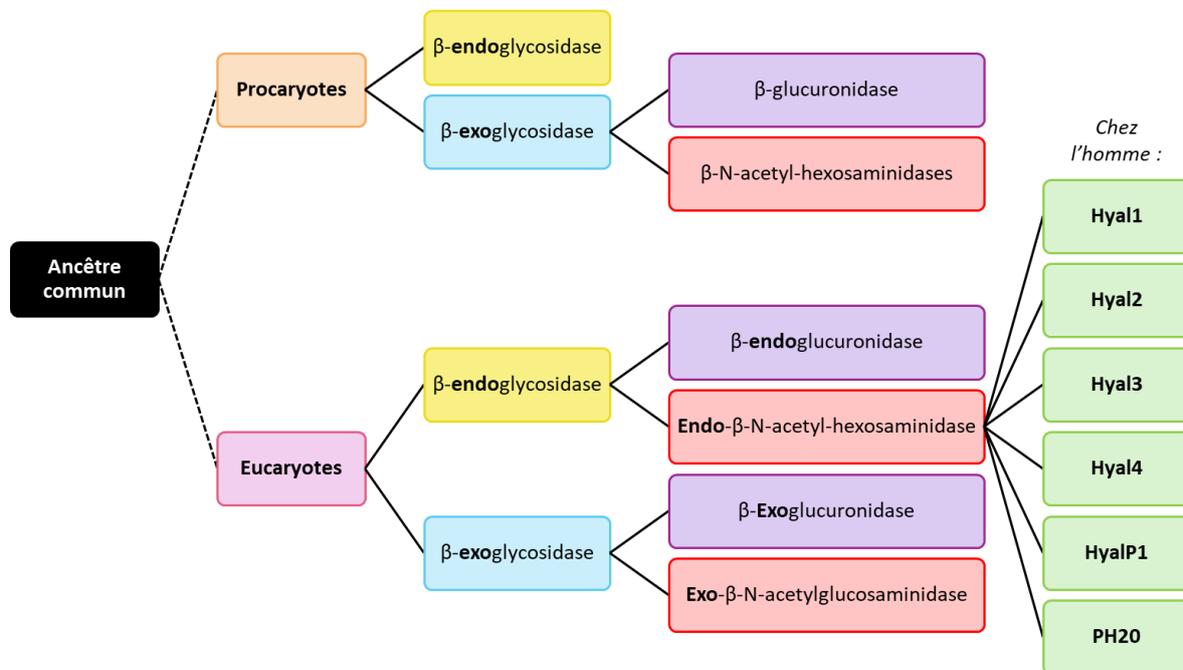


Figure 78 : Classification des différentes classes de hyaluronidases retrouvées chez les eucaryotes et procaryotes – Segeron F.

Chez les procaryotes, on retrouve des β -endoglycosidases et des β -exoglycosidases (241,244):

- Les **β -endoglycosidases** ont un mécanisme de type « lyase » clivant spécifiquement la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ selon une réaction de type β -élimination créant ainsi une insaturation entre le carbone C4 et C5 de l'acide glucuronique (**Figure 79**).
- Les **β -exoglycosidases** regroupent les **β -glucuronidases** et **β -N-acetyl-hexosaminidases**. Ces enzymes sont capables de dégrader l'AH en supprimant un seul saccharide en clivant la liaison $\beta 1 \rightarrow 3$. Le clivage endolytique des polymères par les β -endoglycosidases permet ainsi de fournir de nouveaux substrats pour ces β -exoglycosidases.

Chez les eucaryotes, on retrouve à nouveau ces deux grandes classes de hyaluronidases mais avec un mécanisme de type « hydrolase » (241) :

- Les β -endoglycosidases regroupent deux sous classes, les Endo- β -N-acetyl-hexosaminidases et les β -endoglucuronidases :
 - Les **Endo- β -N-acetyl-hexosaminidases** clivent spécifiquement la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$. Six séquences sont retrouvées dans le génome humain (**Tableau VIII**) codant pour **HYAL1-4, PH20 et HYALP1** et conservent une forte homologie (**Tableau IX**). HyalP1 est un pseudogène c'est-à-dire transcrit mais non traduit. Ainsi, seules HYAL1, HYAL2 et PH20 sont connues pour avoir une activité de hyaluronidase. HYAL2, HYAL4 et PH20 sont reliées à la surface de la membrane plasmique par le GPI (Glycosylphosphatidylinositol) mais peuvent être retrouvées sous forme libre. Une septième enzyme, hyal5 est retrouvée spécifiquement chez la souris.

- Les **β -endoglucuronidases** quant à elles clivent la liaison $\beta 1 \rightarrow 3$ et permettent d'obtenir des tetra-saccharides ou hexo-saccharides. Elles sont par exemple retrouvées chez les crustacée ou la sangsue.
- Les β -exglycosidases sont actives à pH acide et son retrouvées dans les lysosomes. Elles sont capables de cliver une seule unité saccharidique depuis les extrémités non-réductrices du polysaccharide. Deux sous classes sont à nouveau retrouvées, les β -Exoglucuronidases et les Exo- β -N-acetylglucosaminidase :
 - Les **β -Exoglucuronidases** sont retrouvées lors de pathologies (inflammation du foie, cholestase, cirrhose, tuberculose, sarcoïdose etc...) où une augmentation de leur activité peut être observée.
 - Les **Exo- β -N-acetylglucosaminidase** ne contiennent pas de « séquence signal » et seraient par conséquent localisées dans le cytosol chez l'homme. Elles sont également retrouvées chez de nombreux eucaryotes (drosophiles, nématodes et végétaux) et joueraient un rôle d'élagueur d'oligo-saccharides.

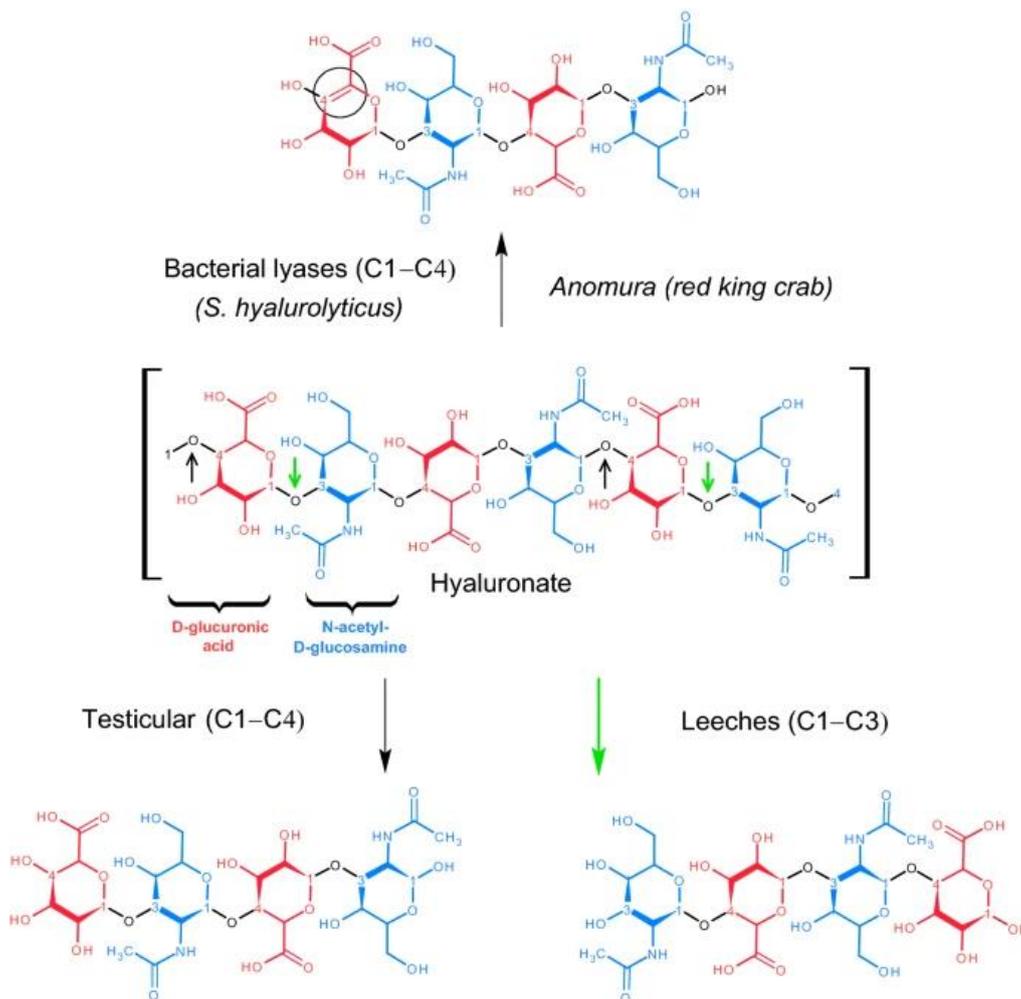


Figure 79 : Clivage des différentes liaisons de l'acide hyaluronique par différentes classes de hyaluronidase. Les flèches vertes indiquent le site de clivage en $\beta 1 \rightarrow 3$ par la hyaluronidase de sangsue (Leeches). Les flèches noires indiquent le site de clivage en $\beta 1 \rightarrow 4$ par les hyaluronidases testiculaires (Testicular) PH20, bactériennes de type lyases et du crabe royal (red king crab) (245).

Dans les tissus somatiques, l'activité des hyaluronidases serait majoritairement liée à HYAL1 et HYAL2. La hyaluronidase HYAL1 est efficace à pH acide dans les lysosomes, elle est capable de cliver n'importe quel taille de polymère et permet d'obtenir principalement des tetra-saccharides. HYAL2 clive l'AH de haut poids moléculaire de la matrice extracellulaire en fragments de 50 unités disaccharidiques (soit environ 20 kDa) et devient ensuite beaucoup moins active (244).

Concernant la hyaluronidase PH20 ou SPAM1 (sperm adhesion molecule 1), cette enzyme est retrouvée spécifiquement, mais pas exclusivement, dans l'acrosome des spermatozoïdes. Son rôle est de faciliter la pénétration de spermatozoïdes dans le cumulus oophorus lors de la fécondation de l'ovocyte. Elle joue également un rôle d'adhésion aux cellules du cumulus. De façon anecdotique, la Hyaluronidase PH20 d'origine bovine est l'enzyme communément utilisée lors d'expérimentations en laboratoire de recherche (244).

ENZYME	GENE HUMAIN	CHROMOSOME HUMAIN	GENE MURIN	CHROMOSOME MURIN
HYAL1	HYAL1	Cluster 3p21.2	hyal1	Cluster 9 F1-F2
HYAL2	HYAL2	Cluster 3p21.2	hyal2	Cluster 9 F1-F2
HYAL3	HYAL3	Cluster 3p21.2	hyal3	Cluster 9 F1-F2
HYAL4	HYAL4	Cluster 7q31.3	hyal4	Cluster 9 6A2
PH20 (ou SPAM1)	PH20	Cluster 7q31.3	ph20	Cluster 9 6A2
HYALP1	HYALP1	Cluster 7q31.3	hyalp1	Cluster 9 6A2
-	-	-	hyal5	Cluster 9 6A2

Tableau VIII : Les différentes hyaluronidase et leur cluster retrouvés chez l'homme et la souris (Hyal5 est spécifique de la souris) (56).

Enzyme	Hyal1	Hyal2	Hyal3	Hyal4	PH20
Hyal1	100	38,3	38,3	38,5	35,1
Hyal2	-	100	38,0	36,4	34,5
Hyal3	-	-	100	33,1	33,7
Hyal4	-	-	-	100	41,7
PH20	-	-	-	-	100

Tableau IX : Homologies de séquences (%) des gènes des hyaluronidases retrouvées chez l'homme (244).

1.2 Mécanisme de dégradation des hyaluronidases humaines

Les hydrolases humaines dégradent l'AH selon un mécanisme de déplacement double (ou double substitution) permettant de conserver la conformation du substrat. Ce mécanisme implique un résidu d'acide glutamique (Glu) de l'enzyme comme donneur de proton et l'oxygène du carbonyle (C=O) porté sur la fonction N-acétyl du saccharide N-acétylglucosamine (**Figure 80**).

Le mécanisme procède comme suivant (244) :

1. La hyaluronidase se lie au substrat à son site catalytique.
2. Les résidus autour du site catalytique positionnent l'oxygène nucléophile du carbonyle à côté de la liaison glycosidique $\beta 1 \rightarrow 4$ à cliver pour faciliter l'attaque sur le carbone C1 du saccharide N-acétylglucosamine. Il s'ensuit la formation d'un intermédiaire par liaison covalente entre le carbone C1* et l'oxygène puis le clivage de la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$. Ce processus entraîne également une inversion de la configuration du carbone anomérique C1*.
3. De manière concomitante, le résidu Glu est déprotoné pour donner son proton au saccharide d'acide glucuronique venant d'être clivé pour former une fonction alcool.
4. Un clivage hydrolytique de la liaison intermédiaire entre le C1* et l'oxygène du carbonyle par une molécule d'eau entraîne la re-protonation du résidu Glu de l'enzyme, la préparant pour une prochaine catalyse. Une seconde inversion de configuration du carbone C1* à lieu.
5. Le polysaccharide est libéré du site actif de la hyaluronidase

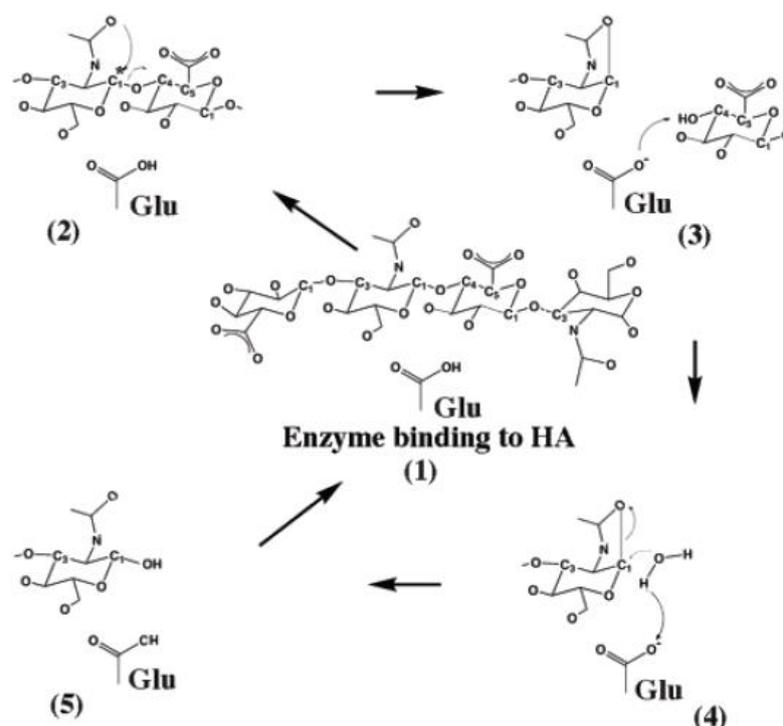


Figure 80 : Mécanisme commun de dégradation de l'acide hyaluronique par les hyaluronidases humaines (244).

1.3 Application de la hyaluronidase en santé et étude in vitro

L'utilisation de la hyaluronidase est réservée à l'usage professionnel et était initialement destinée, entre autres, aux spécialistes en chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique. Du fait de son utilisation en situation d'urgence (correction des effets indésirables graves à type de nécrose consécutive à une injection d'AH) et afin de ne pas retarder la prise en charge des patients, la hyaluronidase est aujourd'hui accessible pour tout médecin. En France, elle relève de la réglementation du médicament mais ne dispose pas d'AMM française. Seule la spécialité Hyaluronidase 1500 UI (générique de la spécialité Hyalase®), sous forme de poudre pour solution à diluer, importée d'Irlande et fabriquée par les laboratoires InstelChimos est disponible (246). Il existe cependant de nombreuses autres spécialités à base de hyaluronidases pouvant être utilisées dans d'autres pays en dehors de l'Europe.

Les produits à base de hyaluronidases peuvent être utilisés en laboratoire pour étudier la sensibilité d'hydrogels d'AH afin de caractériser leur cinétique de dégradation. Ces expérimentations ont également pour but d'avoir une meilleure connaissance des effets de la hyaluronidase et d'améliorer son utilisation pour la correction d'effets indésirables. Il s'agit par exemple des travaux réalisés par Killian Flégeau *et al* dont le but était d'étudier l'effet de l'administration d'une dose fractionnée (multidose) par rapport à une dose unique (247).

Les gels étudiés par l'équipe R&D des laboratoires Teoxane (Suisse) correspondent à la gamme de produits TEOSYAL® RHA (**Tableau X**), il s'agit de gels à base d'AH réticulés par le BDDE indiqués dans le comblement des rides

Produit de comblement	Module de conservation (G')	Concentration en AH (mg.mL ⁻¹)	Degré de modification (%)
TEOSYAL PNT1	58,6	15	1,9
TEOSYAL PNT2	138,9	23	3,1
TEOSYAL PNT3	145,8	23	3,6
TEOSYAL PNT4	263,3	23	4,1

Tableau X : Liste des produits TEOSYAL®. Le module de conservation est mesuré à 25 °C à une fréquence de 1 Hz. Le degré de modification est mesuré par RMN ¹H (résonance magnétique nucléaire du proton) (247).

Pour suivre la cinétique de dégradation des gels, des mesures rhéologiques ont été effectuées à l'aide d'un rhéomètre. De manière simple, le module de conservation (G') des gels est mesuré (après ajout de la hyaluronidase) en fonction du temps à une fréquence oscillatoire de 1 Hz et une température de 37 °C.

Deux types de hyaluronidases ont été utilisées pour réaliser les mesures rhéologiques :

- Hylenex® : Hyaluronidase recombinante humaine avec une activité de 150 USP U.mL⁻¹.
- Hyalase® : Hyaluronidase d'origine ovine en poudre avec une activité de 1500 UI.

Définition de l'unité enzymatique ou unité internationale : L'unité enzymatique correspond à l'activité catalytique d'une enzyme. De symbole « U » (ou parfois « UI »), elle est exprimée par la quantité de substrat transformé par unité de temps en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (avec $1 \mu\text{kat} = 60 \text{ UI}$). Cette unité ne doit pas être confondue avec l'**activité spécifique** correspondant à la quantité de substrat transformé par unité de temps et par masse de protéine en $\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$. Cette unité est définie dans certaines conditions, lorsque USP précède la valeur, les conditions de mesures sont définies selon les standards de l'USP (United-States Pharmacopeia ou Pharmacopée des États-Unis) (248–251).

Les résultats obtenus par l'équipe R&D des laboratoires Teoxane ont permis de montrer dans un premier temps que la dégradation des gels est dépendante de l'activité enzymatique, de la concentration en AH et de la quantité de BDDE utilisée pour la réticulation. Dans un second, ils ont démontré que l'administration répétée de petites doses plutôt qu'une seule dose élevée permet d'augmenter la cinétique de dégradation des gels (**Figure 81**).

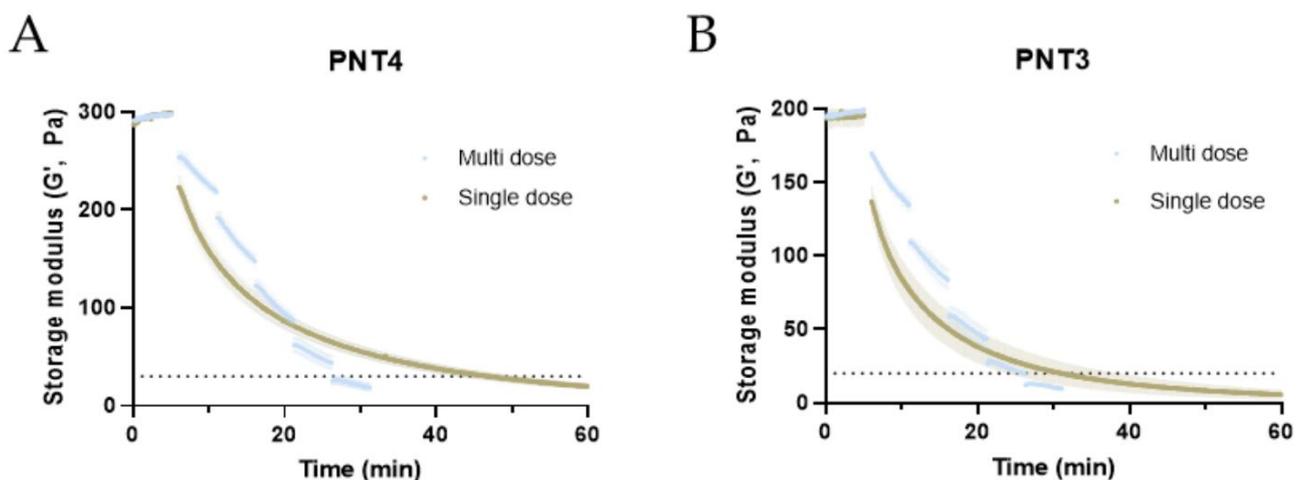


Figure 81 : Cinétiques de dégradation des gels PNT4 (A) et PNT3 (B) après injection en dose unique ou multidose de hyaluronidases Hylenex®. Pour chaque gel, 5 doses de 38,3 U.mL⁻¹ de gel sont injectées et comparées à une dose unique de 191,6 U.mL⁻¹. Les lignes en pointillées représentent 10 % du G' initial. (247).

De manière surprenante, les auteurs ont également observé une cinétique de dégradation différente pour un gel spécifique en fonction du type de hyaluronidase utilisée alors que la même quantité d'unités était utilisée. Cette différence est probablement liée aux divergences des techniques et conditions de mesures de l'activité enzymatique entre la Pharmacopée EU (Hyalase®) et la Pharmacopée US (Hylenex®).

2 Dégradation radicalaire et oxydative

2.1 Génération des radicaux libres

De nombreuses pathologies humaines, lors d'un stress oxydatif, sont associées à une augmentation des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (252). Ces composés chimiques sont nocifs pour les tissus environnants et peuvent entraîner leur déstructuration. Ils peuvent être par exemple retrouvés dans le LS (**Figure 82**) lors d'une arthrose ou d'une polyarthrite rhumatoïde (253). Ces pathologies sont associées à une inflammation des tissus où les neutrophiles sont présents en nombre important et sont capables de relarguer des ROS (241)

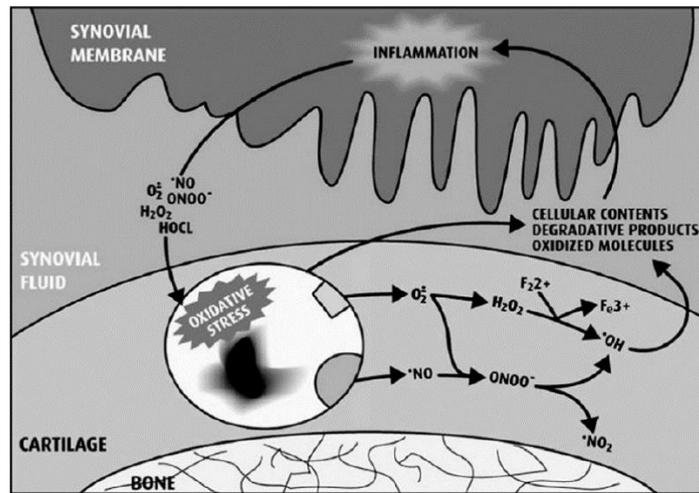


Figure 82 : Effet des espèces réactives de l'oxygène sur le cartilage lors d'une inflammation de la membrane synoviale (253).

Ces ROS peuvent être générés de différentes manières via des réactions chimiques et enzymatiques (**Figure 83**), en proportion davantage importante lors d'une inflammation (241,252,254).

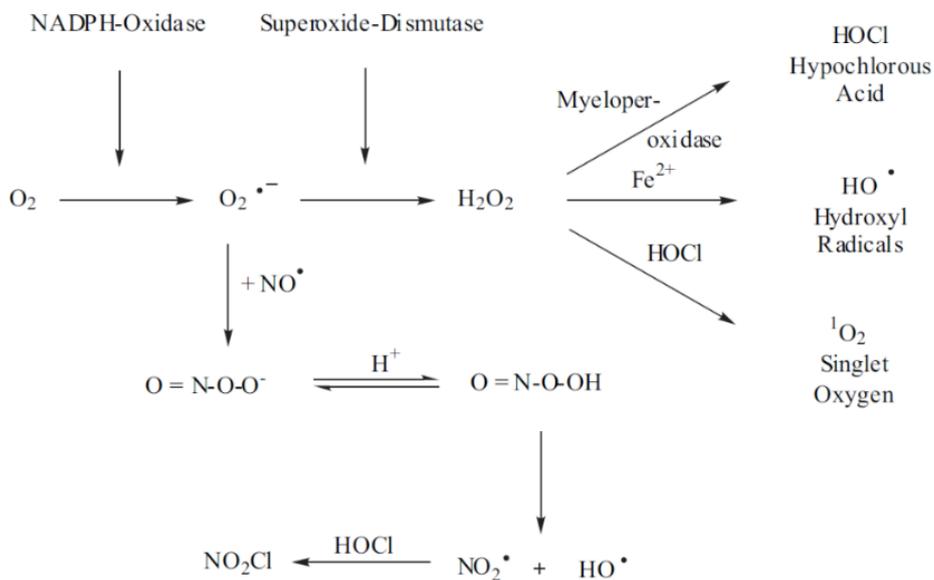


Figure 83 : Schéma réactionnel de la génération d'espèces réactives de l'oxygène dans les neutrophiles (255)

Dans un premier temps, l'**anion superoxyde** ($O_2^{\cdot-}$) est obtenu à partir du dioxygène par l'action de NADPH-Oxydase, une enzyme présente dans les neutrophiles, éosinophiles, macrophages et monocytes. Cet anion peut aussi être formé à partir de la xanthine par l'action de la Xanthine-Oxydase (241). L'anion superoxyde n'est pas capable à lui seul de dégrader l'AH mais peut former l'**anion peroxydite** ($O = N - O - O^-$) en réagissant avec le monoxyde d'azote ($\cdot N = O$), un radical présent *in vivo* via l'action de la NO-Synthase (254). Le peroxydite est par conséquent un agent oxydant très puissant (241). En milieu aqueux son équilibre acido-basique permet la formation de l'**acide peroxyditeux** ($O = N - O - O - H$) pouvant se décomposer après une scission homolytique en deux radicaux, le **dioxyde d'azote** (NO_2^{\cdot}) et le **radical hydroxyle** (HO^{\cdot}).

De manière spontanée, à pH acide, les anions superoxydes peuvent former le **peroxyde d'hydrogène** ($H - O - O - H$) tandis que sa synthèse *in vivo* est catalysée par la Superoxyde-Dismutase. A partir du peroxyde d'hydrogène, plusieurs composés toxiques peuvent être obtenus :

- L'**acide hypochloreux** ($H - O - Cl$), obtenu par l'action de Myélopéroxydases (MPO), elles-mêmes relarguées par les neutrophiles après stimulation (256). Par ailleurs, la MPO a été retrouvée dans le liquide synovial de patients atteint de polyarthrite rhumatoïde (257). L'acide hypochloreux est un agent de chloration avec un pouvoir oxydant puissant (241).
- A nouveau, le **radical Hydroxyle** (HO^{\cdot}) est obtenu ici en présence de fer ferreux (Fe^{2+}) via la réaction de Fenton, une réaction fréquemment utilisée en expérimentations. Bien que le Fer soit sous forme liée *in vivo* (liaison à la transferrine ou ferritine), en conditions de stress il peut être retrouvé sous forme libre dans le liquide synovial (255,258).
- L'**oxygène singulet** (1O_2), obtenu après réaction avec l'acide hypochloreux. L'oxygène singulet correspond à un état excité de l'atome d'oxygène qui en retournant à son état fondamental (oxygène triplet) émet une onde électromagnétique capable d'avoir des effets cytotoxiques et de causer des dommages sur certains biopolymères tel que l'AH (241,254).

2.2 Mécanismes de dégradation

❖ Dégradation par le radical hydroxyle

La réaction de dégradation des saccharides par le radical hydroxyle est complexe et peut aboutir à la formation de plusieurs composés. Le rendement de la réaction dépend notamment de la présence et du taux de dioxygène dans l'environnement réactionnel (255). La première étape consiste en la capture d'un atome d'hydrogène par le radical hydroxyle, préférentiellement en **C1** (carbone anomérique) de l'acide glucuronique, aboutissant à la formation d'un **radical alkyl**.

La seconde étape consiste en l'ajout d'une molécule de dioxygène sur le radical alkyl pour former un **radical peroxy**. Ces deux premières étapes sont des réactions contrôlées par la diffusion (255). Ensuite, plusieurs réactions peuvent avoir lieu (**Figure 84**) :

- **Scission de la liaison glycosidique** : Perte de l'anion superoxyde avec formation d'un carbocation puis ajout d'une molécule d'eau suivie d'une déprotonation. Un hydroxyle est alors ajouté sur le carbone C1 et permet la coupure de la liaison osidique $\beta 1 \rightarrow 3$.
- **Ouverture du cycle** : Intervention d'autres radicaux avec création d'un radical oxygène intermédiaire et ouverture du cycle en C1 du résidu acide glucuronique.

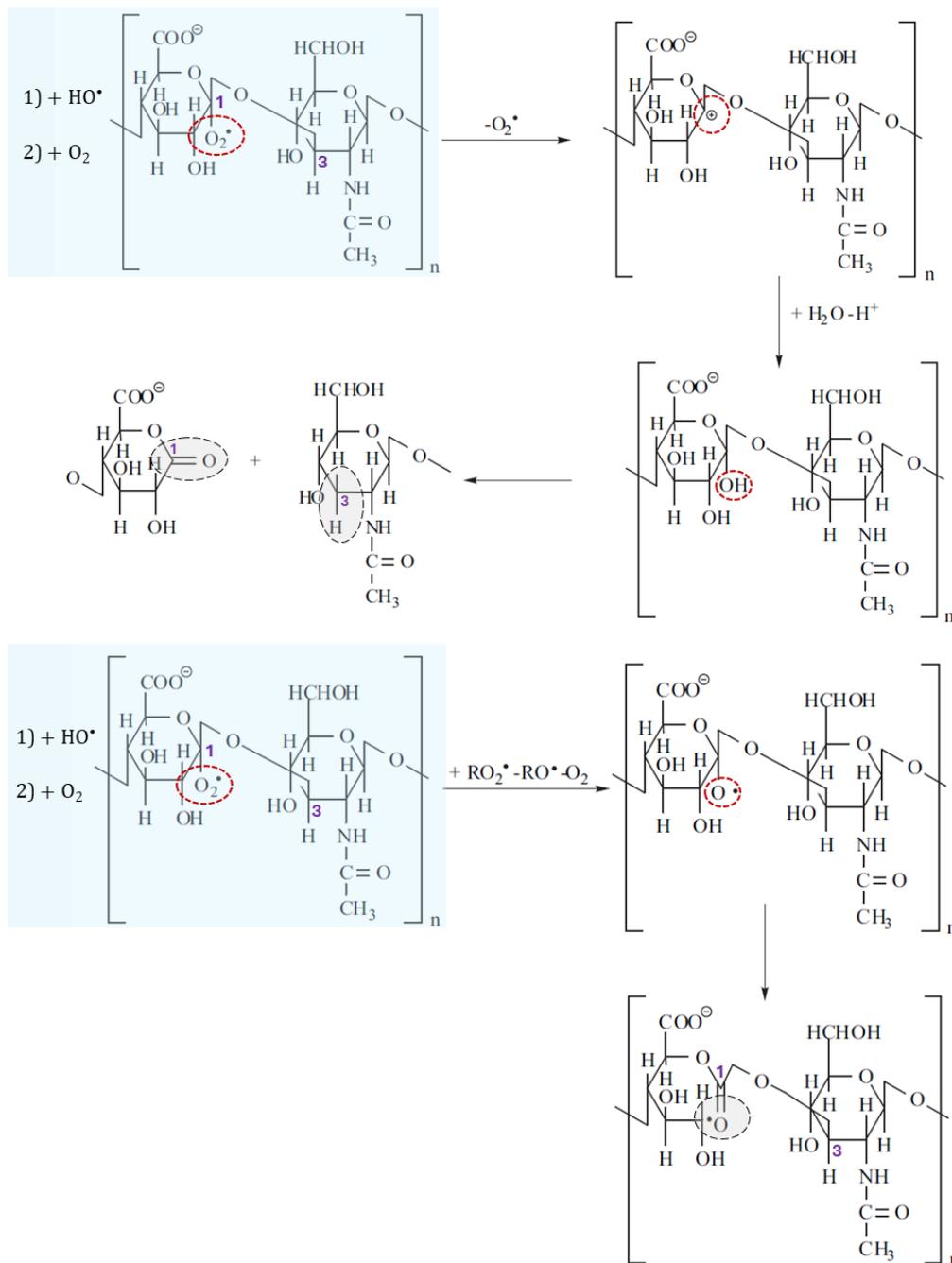


Figure 84 : Voies de dégradation possibles de l'acide hyaluronique par le radical hydroxyle à partir du résidu d'acide glucuronique. Modifiée à partir de la référence (255).

❖ Dégradation par l'acide hypochloreux

D'après les travaux menés par *Rees et al* (259,260), la dégradation de l'AH par l'acide hypochloreux débute par la formation d'un dérivé **chloramide** sur le saccharide N-acétylglucosamine. Un **radical amidyle** est ensuite formé soit en présence d'un métal de transition, soit de manière indépendante. Une rapide réaction intramoléculaire se produit ensuite pour former un **radical centré sur le carbone** en C4 du résidu d'acide glucuronique par un transfert d'hydrogène 1,5. Une scission β de la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ se produit alors, indépendamment du pH et aboutissant à la formation d'un radical en C1 sur le saccharide N-acétylglucosamine (**Figure 85**). Une voie alternative en présence de dioxygène est proposée à partir du radical centré sur le carbone de l'acide glucuronique. Cette voie aboutie à la formation d'un **radical peroxy** sur ce même résidu avec de nouveau un transfert d'hydrogène 1,5 pour former un radical en C1 sur le résidu N-acétylglucosamine. En présence de dioxygène et de l'anion superoxyde, ce radical forme un carbocation, capable de réagir avec l'eau et provoquant la scission de la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$.

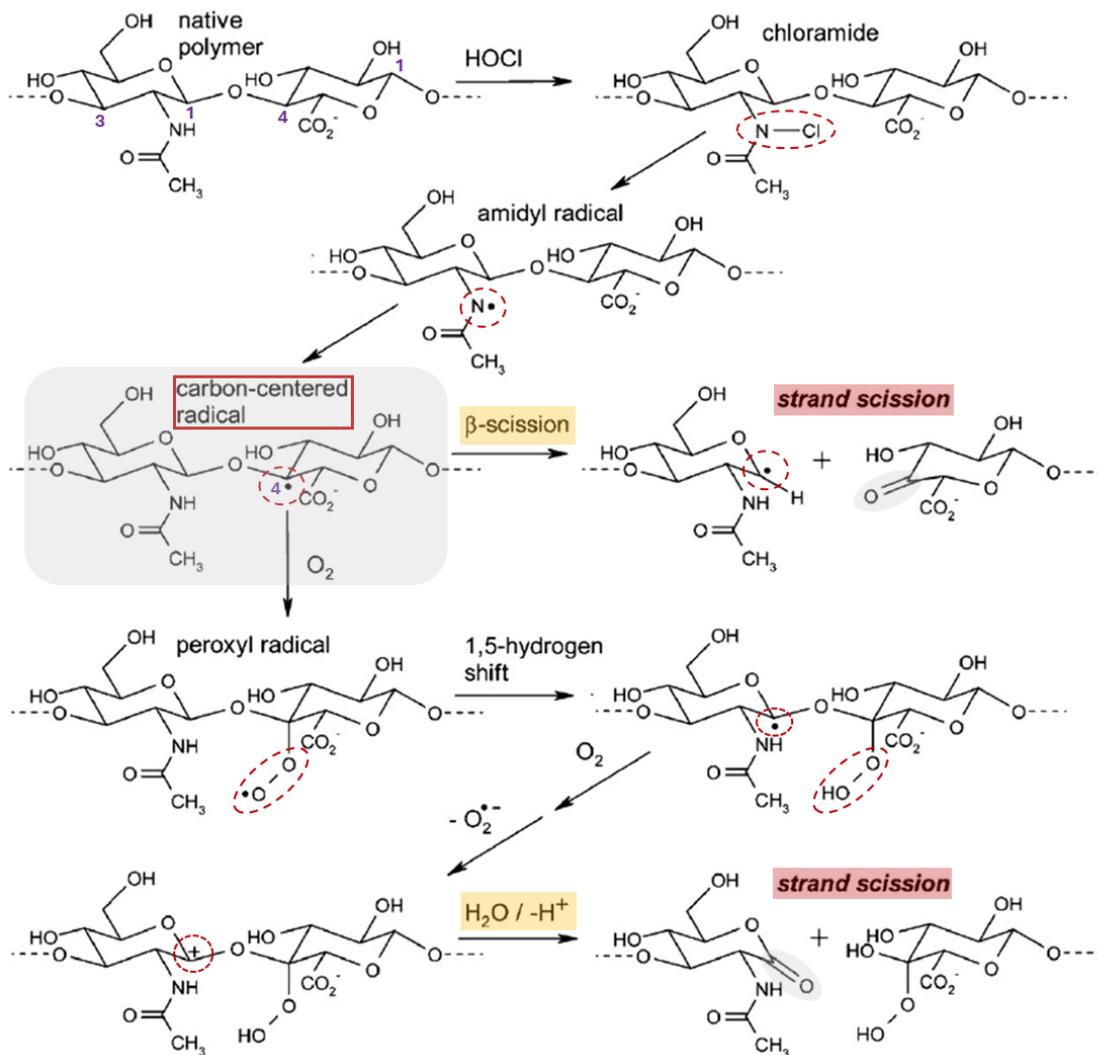


Figure 85 : Voies de dégradation de l'acide hyaluronique par l'acide hypochloreux à partir du résidu N-acétylglucosamine. Modifiée à partir de la référence (260).

2.3 Étude in vitro

La présence des ROS dans une articulation atteinte d'ostéoarthrite est un frein à l'application de l'AH dans la viscosupplémentation. Après injection, un produit à base d'AH serait rapidement dégradé par les espèces chimiques observées précédemment. Dans ce contexte, certains produits contiennent des antioxydants capables de piéger les ROS, il peut s'agir par exemple du Mannitol. *Conrozier T et al.* (261) ont mis en évidence cette propriété antioxydante du Mannitol dans des produits à base d'AH indiqué pour la viscosupplémentation. Pour cela, les auteurs ont notamment étudié deux produits :

- **HYLAN G-F 20** (Synvisc-one[®], Sanofi), un gel partiellement réticulé avec une concentration en AH de 8 g.L⁻¹ ne contenant pas de Mannitol.
- **HANOX-M-XL** (HappyCross[®], Laboratoires LABRHA), un gel réticulé avec une concentration en AH de 16 g.L⁻¹ et contenant du Mannitol à une concentration de 35 g.L⁻¹.

Leur système de génération de radicaux libres contient uniquement du peroxyde d'hydrogène, les auteurs ne précisent pas le type de radicaux générés. Cependant, il peut s'agir de radicaux hydroxyles générés via la réaction de Fenton permis par la présence de métaux de transition (Fe ou Cu entre autres). En effet, le Fer peut être retrouvé à l'état de traces (quelques μM) dans l'AH (**Annexe IV**) et serait ainsi en quantité suffisante pour déclencher la réaction de Fenton (262).

A l'aide de mesures rhéologiques, les auteurs ont suivi l'évolution des modules élastiques (G') et visqueux (G'') des gels après mélange avec le peroxyde d'hydrogène. Les mesures sont réalisées dans le domaine linéaire des gels (c'est-à-dire à une fréquence d'oscillation comprise dans une plage de fréquence où les modules ne varient pas), soit une fréquence angulaire (ω) de 1 Hz.

Les résultats obtenus montrent une importante diminution du module G' du produit HYLAN G-F 20 correspondant au gel ne contenant pas de Mannitol (**Figure 86**). Le gel HANOX-M-XL contenant du Mannitol reste quant à lui relativement stable avec un G' très légèrement diminué. Il est important de noter que le G' initial à t_0 du gel HANOX-M-XL est largement supérieur du fait de sa concentration en AH correspondant au double de celle du gel HYLAN G-F 20. De plus, le produit HYLAN G-F 20 est partiellement réticulé.

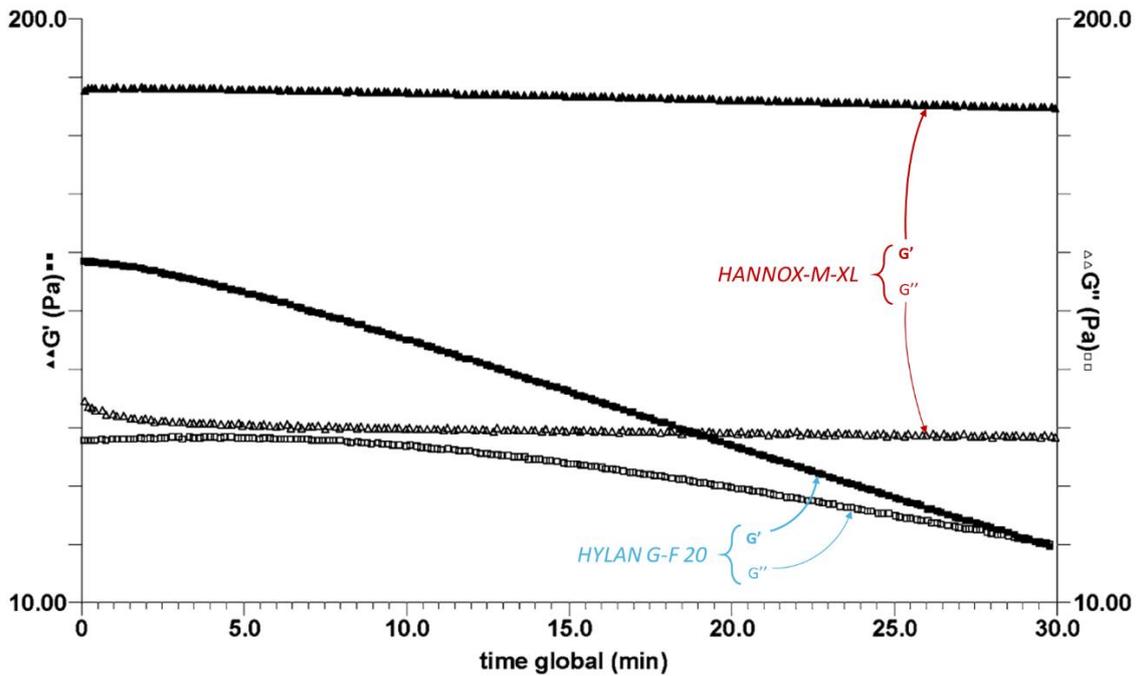


Figure 86 : Evolution des modules G' et G'' des produits de viscosupplémentation HYLAN G-F 20 et HANNOX-M-XL en condition de stress oxydatif (H_2O_2). Modifiée à partir de la référence (261).

Bien que les gels contenant ou non du Mannitol n'aient pas exactement les mêmes caractéristiques (concentration en AH et degré de réticulation), en considérant les pourcentages de dégradation (Figure 87), l'étude *in vitro* menée par Conrozier T et al. prouve qu'une forte concentration en mannitol permet de protéger les hydrogels de la dégradation radicalaire. Cette protection permettrait ainsi aux produits de viscosupplémentation d'avoir en temps de résidence allongé lors d'une injection dans une articulation atteinte d'une inflammation.

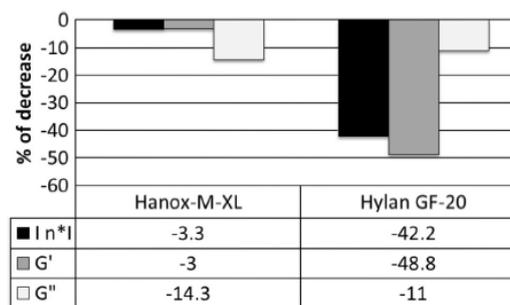


Figure 87 : Dégradation (%) de la viscosité complexe (η^*) et des modules G' et G'' des gels HYLAN G-F-20 et HANNOX-M-XL (261).

De plus, les auteurs ont également comparé la dégradation du gel HANNOX-M, l'homologue du gel HANNOX-M-XL en version non réticulée (concentrations en AH et Mannitol et poids moléculaire identiques). Les résultats obtenus ont montré une meilleure résistance à la dégradation pour le gel réticulé. De ce fait, cette comparaison permet également de démontrer que la réticulation est un facteur permettant aux gels de résister à la dégradation radicalaire.

CONCLUSION GENERALE

L'acide hyaluronique est une molécule ubiquitaire présente au sein de nombreux être vivants tels que les vertébrés, les bactéries et certains fungi. Bien qu'il ne soit pas retrouvé chez les végétaux et les virus, des techniques biotechnologiques permettent de les utiliser afin de devenir une source potentiel de ce polymère.

Il s'agit d'une molécule présentant un grand intérêt en santé du fait de ses propriétés biocompatibles et de son pouvoir hygroscopique. Ses fonctions biologiques dans le corps humain sont très variées et peuvent comprendre simplement un rôle de structuration et de maintien de l'hydratation jusqu'à son implication dans les processus de cancérisation. Il est également impliqué dans de nombreux processus de signalisation cellulaire via ses principaux récepteurs, CD44 et RHAMM. Ses mécanismes sont parfois complexes et peuvent avoir des effets opposés dépendant principalement de sa taille. Il permet ainsi de jouer un rôle de régulateur dans le processus de cicatrisation en intervenant à plusieurs niveaux tels que l'inflammation, l'angiogenèse, la prolifération et motilité cellulaire ainsi que le remodelage tissulaire.

Les recherches menées autour de ses fonctions biologiques et sa caractérisation physico-chimique ont permis de démontrer l'intérêt de ce polymère en santé et l'émergence de nouvelles thérapies. Découvert initialement dans l'humeur vitrée du bovin et ensuite produit à partir de crêtes de coqs, les progrès des techniques biotechnologiques sont devenus un réel atout pour sa production en obtenant un produit assurant davantage la sécurité des patients et en devenant plus accessible.

Cependant, ce polysaccharide reste sensible à de nombreux agents dont notamment les ROS et la hyaluronidase. Des techniques de réticulation se sont alors développées afin de prolonger sa longévité tout en maintenant son caractère biocompatible. Ces techniques se sont révélées particulièrement efficaces pour son application en esthétique comme produit de visco-augmentation ou en arthrologie dans la visco-supplémentation. L'approfondissement des connaissances de sa sensibilité à la hyaluronidase permet également d'améliorer la prise en charge des patients dans le traitement d'effets indésirables consécutifs à une injection d'acide hyaluronique.

Les produits à base d'acide hyaluronique sont le plus souvent destinés à l'injection. Leurs contrôles sont stricts et doivent répondre à des critères de stérilité et d'apyrogénicité, que ce soit en tant que médicament ou dispositif médical. Ces produits sont soumis à diverses réglementations, notamment la MDR qui concerne les dispositifs médicaux, à la suite de plusieurs scandales sanitaires ayant conduit à leur émergence. La particularité de fluide non-newtonien pseudoplastique ou encore viscoélastique de l'acide hyaluronique fait également intervenir des contrôles rhéologiques. Des données relatives à sa viscosité et son élasticité permettent ainsi aux industriels de contrôler la qualité de leurs produits.

Bien qu'il soit largement utilisé en cosmétique ainsi que dans le dispositif médical, ses applications en tant que médicament restent limitées. Cependant, son utilisation comme DDS et les recherches actuelles permettront d'élargir ses applications. La sensibilité de ce polymère à différents agents peut être tournée à son avantage en permettant la libération contrôlée de substances actives. De plus, l'encapsulation de substances active au sein de matrices d'acide hyaluronique permet leur protection vis-à-vis de ces différents agents. Ce polymère est facilement modifiable chimiquement et peut être associée à d'autres systèmes de formulation telles que les émulsions.

De ce fait, l'AH est un produit très modulable pouvant s'associer à de nombreux médicaments ou formulations pré existantes afin d'améliorer leur biodisponibilité et leur efficacité. Il peut présenter par exemple un intérêt en cancérologie en ciblant spécifiquement les tissus tumoraux surexprimant le CD44. De plus, sa capacité d'encapsulation ne se limite pas aux substances actives, il est également capable de contenir du matériel génétique en vue d'une application en thérapie génique ou encore des cellules en vue d'applications en thérapie cellulaire et ingénierie tissulaire.

Le développement de nouveaux DDS en chirurgie dentaire fait également partie des recherches actuelles dans la résolution de l'inflammation afin d'obtenir un nouveau traitement pour la parodontite ou la pulpite.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242(1):27-33.
2. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. Vol. 10, *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd; 2014. p. 1558-70.
3. Pomarede N. Haluronic acid. *Ann Dermatol Venereol*. 2008;135(1 PART 3):35-8.
4. NCC Nutrition Cosmetics Creation SA. L'acide hyaluronique, un actif essentiel au service de la nutricosmétique [Internet]. [cité 20 nov 2023]. Disponible sur: <https://www.nccreation.ch/fr/acide-hyaluronique-un-actif-incontournable-au-service-de-la-nutricosmetique/>
5. Gall Y. Hyaluronic acid: Structure, metabolism and implication in cicatrisation. *Ann Dermatol Venereol*. 2010;137(SUPPL. 1).
6. Medecine Key. Anatomie fonctionnelle des structures de mouvement [Internet]. [cité 14 nov 2023]. Disponible sur: <https://clemedicine.com/2-anatomie-fonctionnelle-des-structures-de-mouvement/>
7. Damiano J, Bardin T. Liquide synovial normal et pathologique Synovial fluid. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie*. 2004;1(1):2-16.
8. Jay GD, Waller KA. The biology of Lubricin: Near frictionless joint motion. *Matrix Biology*. 1 oct 2014;39:17-24.
9. Seror J, Zhu L, Goldberg R, Day AJ, Klein J. Supramolecular synergy in the boundary lubrication of synovial joints. *Nat Commun*. 10 mars 2015;6.
10. Noble P, Bernardin C, Jacqueline LB, Adrien M, J. M. D, Didier S. L'articulation synoviale : un système tribologique parfait. *Ann Med Vet* [Internet]. 2010 [cité 13 nov 2023];154:83-93. Disponible sur: http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2010_154_2_03.pdf
11. Lin W, Liu Z, Kampf N, Klein J. The Role of Hyaluronic Acid in Cartilage Boundary Lubrication. *Cells*. 2 juill 2020;9(7).
12. Sriskandan S, Faulkner L, Hopkins P. Streptococcus pyogenes: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007;39(1):12-9.
13. Hurst JR, Shannon BA, Craig HC, Rishi A, Tuffs SW, McCormick JK. The Streptococcus pyogenes hyaluronic acid capsule promotes experimental nasal and skin infection by preventing neutrophil-mediated clearance. *PLoS Pathog*. 1 nov 2022;18(11).
14. Wessels MR, Moses AE, Goldberg JB, Dicesare TJ. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(19):8317-21.
15. Nazeri A, Niazi A, Afsharifar A, Taghavi SM, Moghadam A, Aram F. Heterologous production of hyaluronic acid in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing a human hyaluronan synthase 2. *Sci Rep*. 1 déc 2021;11(1).
16. Shikina E V., Kovalevsky RA, Shirkovskaya AI, Toukach P V. Prospective bacterial and fungal sources of hyaluronic acid: A review. *Comput Struct Biotechnol J*. 1 janv 2022;20:6214-36.
17. Sun L, Liu G, Li Y, Jiang D, Guo W, Xu H, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of endocrocin and emodin. *Metab Eng*. 1 juill 2019;54:212-21.

18. de Oliveira JD, Carvalho LS, Gomes AMV, Queiroz LR, Magalhães BS, Parachin NS. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microb Cell Fact*. 1 juill 2016;15(1).
19. Wikipédia. Épisode [Internet]. [cité 5 déc 2023]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89pisode>
20. DeAngelis PL, Jing W, Graves M V., Burbank DE, Van Etten JL. Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1. *Science*. 5 déc 1997;278(5344):1800-3.
21. Rakkhumkaew N, Shibatani S, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Hyaluronan Synthesis in Cultured Tobacco Cells (BY-2) Expressing a Chlorovirus Enzyme: Cytological Studies. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110:1174-9.
22. Speciale I, Notaro A, Abergel C, Lanzetta R, Lowary TL, Molinaro A, et al. The Astounding World of Glycans from Giant Viruses. *Chem Rev*. 2022;122(20):15717-66.
23. Kadi S. Systèmes associatifs à base d'acide hyaluronique modifié : synthèse et étude des relations structure/propriétés rhéologiques [Thèse]. [Grenoble]: Université Joseph Fourier; 2007.
24. Hadrich A. Nouveaux hydrogels à base de polysaccharide obtenus par voie biomimétique ou par photoréticulation [Thèse]. [Nantes]: Université de Rouen Normandie; 2019.
25. Scott JE. Secondary Structures in Hyaluronan Solutions: Chemical and Biological Implications. *Ciba Found Symp*. 1989;143:6-20.
26. Haxaire K, Braccini I, Milas M, Rinaudo M, Pérez S. Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling. *Glycobiology*. 2000;10(6):587-94.
27. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R, Uspenskaya M. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. *Polymers (Basel)*. 1 août 2020;12(8):1800.
28. Scott JE, Cummings C, Brasst A, Cheni Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J*. 1991;274(Pt 3):699-705.
29. Scott JE, Heatley F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 avr 1999;96(9):4850-5.
30. Owen SC, Kuo JW, Prestwich GD. 2.14 Hyaluronic acid. In: *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier; 2017. p. 306-31.
31. NCBI. PubChem - Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) [Internet]. 2024 [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/glycans/snfg.html>
32. Nusgens B V. Hyaluronic acid and extracellular matrix: A primitive molecule? *Ann Dermatol Venereol*. 2010;137(SUPPL. 1).
33. Advanced BioMatrix. HyStem / Hyaluronic Acid [Internet]. [cité 15 janv 2024]. Disponible sur: <https://advancedbiomatrix.com/hyaluronic-acid/>
34. Saari H, Konttinen YT, Friman C, Sorsa T. Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. *Inflammation*. 1993;17(4).
35. Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine. Masse Molaire [Internet]. [cité 15 janv 2024]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/le-dictionnaire/index.php?q=masse+molaire>

36. Prohaska T, Irrgeher J, Benefield J, Böhlke JK, Chesson LA, Coplen TB, et al. Standard atomic weights of the elements 2021 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 1 mai 2022;94(5):573-600.
37. Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. Vol. 60, *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 2007. p. 1110-9.
38. Rwei SP, Chen SW, Mao CF, Fang HW. Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions. *Biochem Eng J*. 1 juin 2008;40(2):211-7.
39. Poinot M. L'acide hyaluronique : Production microbiologique et applications [Thèse]. [Nancy]: Université Henri Poincaré; 2011.
40. Ghosh S, Kobalj I, Zanette D, Reed' WF. Conformational Contraction and Hydrolysis of Hyaluronate in Sodium Hydroxide Solutions. *Macromolecules*. 1993;26(17):4685-93.
41. Gatej I, Popa M, Rinaudo M. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution. *Biomacromolecules*. 2005;6(1):61-7.
42. Pisarcik M, Bako D. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. Vol. 97, A: *Physicochemical and Engineering Aspects*. 1995.
43. Berriaud N, Milas M, Rinaudo M. Characterization and Properties of Hyaluronic Acid (Hyaluronan). *Polysaccharides*. 1998;(10):313-34.
44. Hofmann H, Schmut O, Sterk H, Kopp H. Spin-lattice-relaxationtime-T1 measurements of hyaluronic acid. *Z Naturforsch C Biosci*. 1979;34(7-8):508-11.
45. Tokita Y, Okamoto A. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polym Degrad Stab*. 1995;48(2):269-73.
46. L' Lapčík Jr., P. Chabreček, A. Staško. Photodegradation of Hyaluronic Acid: EPR and Size Exclusion Chromatography Study. In: *Biopolymers*. 1991. p. 1429-35.
47. M Reháková, D Bakos, M Soldán, K Vizárová. Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution. *Int J Biol Macromol*. 1994;16(3):121-4.
48. Dřimalová E, Velebný V, Sasinková V, Hromádková Z, Ebringerová A. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydr Polym*. 21 sept 2005;61(4):420-6.
49. Ferreira SH, Rovisco A, Santos A Dos, Águas H, Igreja R, Barquinha P, et al. Porous ZnO Nanostructures Synthesized by Microwave Hydrothermal Method for Energy Harvesting Applications. *Nanopores [Internet]*. 2021 [cité 16 avr 2024];571-90. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97060>
50. K Kubo, T Nakamura, K Takagaki, Y Yoshida, M Endo. Depolymerization of hyaluronan by sonication. Vol. 10, *Glycoconjugate Journal*. 1993.
51. Vercruyse KP, Lauwers AR, Demeester JM. Absolute and empirical determination of the enzymic activity and kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using viscosimetry. *Biochem J*. 1995;306(Pt 1):153-60.
52. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. Vol. 4, *Dermato-Endocrinology*. Landes Bioscience; 2012.
53. Laurent UBG, Reed RK. Turnover of hyaluronan in the tissues. Vol. 7, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991.
54. Itano N, Kimata K. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. *Semin Cancer Biol*. août 2008;18(4):268-74.

55. Priem B, Perez S, Pérez S. The contribution of glycobiotechnology to the main stream of biomedical field. *Glycosciences and Life Sciences*. 2018;1(1):1-18.
56. Bastow ER, Byers S, Golub SB, Clarkin CE, Pitsillides AA, Fosang AJ. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cellular and Molecular Life Sciences*. févr 2008;65(3):395-413.
57. Maloney FP, Kuklewicz J, Corey RA, Bi Y, Ho R, Mateusiak L, et al. Structure, substrate recognition and initiation of hyaluronan synthase. *Nature*. 7 avr 2022;604(7904):195-201.
58. Itano N, Kimata K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J Biol Chem*. 1996;271(17):9875-8.
59. Shyjan AM, Heldin P, Butcher EC, Yoshino T, Briskin MJ. Functional Cloning of the cDNA for a Human Hyaluronan Synthase. *J Biol Chem*. 1996;271(38):23395-999.
60. Itano N, Kimata K. Molecular Cloning of Human Hyaluronan Synthase 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;222(3):816-20.
61. Spicer AP, Augustine M Lou, Mcdonald JA. Molecular Cloning and Characterization of a Putative Mouse Hyaluronan Synthase. *J Biol Chem*. 1996;271(38):23400-6.
62. Watanabe K, Yamaguchi Y. Molecular Identification of a Putative Human Hyaluronan Synthase. *J Biol Chem*. 1996;271(38):22945-8.
63. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties. *J Biol Chem*. 1999;274(35):25085-92.
64. T D Camenisch, A P Spicer, T Brehm-Gibson, J Biesterfeldt, M L Augustine, A Calabro Jr, et al. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *Exp Clin Cardiol*. 2000;6(No 1 Spring).
65. Camenisch TD, Biesterfeldt J, Brehm-Gibson T, Bradley J, Mcdonald JA. Regulation of cardiac cushion development by hyaluronan. *Exp Clin Cardiol*. 2001;6(1):4-10.
66. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*. 30 mai 1997;272(22):13997-4000.
67. Sato K, Hirano M, Nakashima T. Fine structure of the human newborn and infant vocal fold mucosae. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110(5 Pt 1):417-24.
68. Isacke CM, Yarwood H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(7):718-21.
69. Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R. Variant Cell Lines Selected for Alterations in the Function of the Hyaluronan Receptor CD44 Show Differences in Glycosylation. *J Exp Med*. 1995;182(2):431-7.
70. Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett*. 1998;131(1):3-11.
71. De La Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear Leukocytes Bind to Specific Hyaluronan Structures on Colon Mucosal Smooth Muscle Cells Treated with Polyinosinic Acid:Polycytidylic Acid Inter-Trypsin Inhibitor Is Crucial to Structure and Function. Vol. 163, *American Journal of Pathology*. 2003.
72. Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev*. 10 nov 2007;59(13):1351-65.

73. Messam BJ, Tolg C, McCarthy JB, Nelson AC, Turley EA. Rhamm is a multifunctional protein that regulates cancer progression. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2021.
74. Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J Intern Med.* 1997;242(1):61-6.
75. Institut National du Cancer. La peau [Internet]. [cité 2 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Melanome-de-la-peau/La-peau>
76. M Meyer LJ, Stern R. Age-Dependent Changes of Hyaluronan in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 1994;102(3):385-9.
77. M O Longas, C S Russell, X Y He. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. Vol. 159, *Carbohydrate Research.* 1987.
78. Hyléria Paris. Tout comprendre sur l'acide hyaluronique [Internet]. [cité 2 mars 2024]. Disponible sur: <https://hyleriaparis.com/blogs/le-carnet/quest-ce-que-lacide-hyaluronique>
79. J Uitto. Understanding premature skin aging. *N Engl J Med.* 1997;337(20):1463-5.
80. Severson A. The effect of cyclic nucleotides on the incorporation of 3H-glucosamine into hyaluronate in bone organ culture. *Hormone and metabolic research.* 1978;10(3):256-60.
81. Severson AR. Inhibition of Bone Resorption and Increased Incorporation of 3H-Glucosamine into Hyaluronate in Bone Organ Cultures Treated with Dibutylrly Cyclic A M P and Colchicine1. *Expl Cell Biol.* 1983;51(2):70-6.
82. Chae Cho B, Woo Park J, Soo Baik B, Chan Kwon I, San Kim I, Seoul K. The Role of Hyaluronic Acid, Chitosan, and Calcium Sulfate and Their Combined Effect on Early Bony Consolidation in Distraction Osteogenesis of a Canine Model. *J Craniofac Surg.* 2002;13(6):783-93.
83. Lataillade JJ, Albanese P, Uzan G. Implication of hyaluronic acid in normal and pathological angiogenesis. Application for cellular engineering. *Ann Dermatol Venereol.* 2010;137(SUPPL. 1).
84. West DC, Kumar S. The Effect of Hyaluronate and Its Oligosaccharides on Endothelial Cell Proliferation and Monolayer Integrity. *Exp Cell Res.* 1989;183(1):179-96.
85. Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer.* 1997;71(2):251-6.
86. Gao F, Yang CX, Mo W, Liu YW, He YQ. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clinical and Investigative Medicine.* 2008;31(3):E106-16.
87. Sattar A, Rooney P, Kumar S, Pye D, West D, Ledger P. Application of Angiogenic Oligosaccharides of Hyaluronan Increases Blood Vessel Numbers in Rat Skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 1994;103(4):576-9.
88. Ohno-Nakahara M, Honda K, Tanimoto K, Tanaka N, Doi T, Suzuki A, et al. Induction of CD44 and MMP Expression by Hyaluronidase Treatment of Articular Chondrocytes. *J Biochem.* 2004;135(5):567-75.
89. Zhang Y, Thant AA, Machida K, Ichigotani Y, Naito Y, Hiraiwa Y, et al. Hyaluronan-CD44s signaling regulates matrix metalloproteinase-2 secretion in a human lung carcinoma cell line QG90 - PubMed. *Cancer research* vol 62. 2002;62(14):3962-5.
90. Fjeldstad K, Kolset S. Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr Drug Targets.* 30 août 2005;6(6):665-82.

91. Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). *Int J Cancer*. 1995;60(5):632-6.
92. Bot P, Hoefer I, Piek J, Pasterkamp G. Hyaluronic acid: targeting immune modulatory components of the extracellular matrix in atherosclerosis. *Curr Med Chem*. 27 mars 2008;15(8):786-91.
93. Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Selleri S, Sommariva M, Sfondrini L, et al. Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J Immunol*. 1 août 2008;181(3):2103-10.
94. Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem*. 23 avr 2004;279(17):17079-84.
95. Genasetti A, Vigetti D, Viola M, Karousou E, Moretto P, Rizzi M, et al. Hyaluronan and human endothelial cell behavior. *Connect Tissue Res*. mai 2008;49(3):120-3.
96. Penneys NS. CD44 expression in normal and inflamed skin. *J Cutan Pathol*. 1993;20(3):250-3.
97. Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol*. janv 2007;26(1):58-68.
98. Savani RC, Khalil N, Turley EA. Hyaluronan receptor antagonists alter skin inflammation and fibrosis following injury. *Proc West Pharmacol Soc*. 1995;38:131-6.
99. Szczepanek K, Kieda C, Cichy J. Differential binding of hyaluronan on the surface of tissue-specific endothelial cell lines. *Acta Biochim Pol*. 2008;55(1):35-42.
100. Fieber C, Baumann P, Vallon R, Termeer C, Simon JC, Hofmann M, et al. Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J Cell Sci*. 15 janv 2004;117(Pt 2):359-67.
101. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol*. 1 mai 2018;9(MAY):419.
102. Jimenez PA, Rampy MA. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res*. 1999;81(2):238-42.
103. Messadi D V, Bertolamit CN, Ofdentistty S, Crippled SH. CD44 and hyaluronan expression in human cutaneous scar fibroblasts. *Am J Pathol*. 1993;142(4):1041.
104. Dereure O. Acide hyaluronique et immunité. *Ann Dermatol Venereol*. 1 avr 2010;137(SUPPL. 1):S26-9.
105. Jackson DG. Immunological functions of hyaluronan and its receptors in the lymphatics. *Immunol Rev*. juill 2009;230(1):216-31.
106. Kaul A, Short WD, Keswani SG, Wang X. Immunologic Roles of Hyaluronan in Dermal Wound Healing. *Biomolecules* [Internet]. 1 août 2021 [cité 12 avr 2024];11(8). Disponible sur: /pmc/articles/PMC8394879/
107. Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(3):208-20.
108. Johnson P, Maiti A, Brown KL, Li R. A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response? *Biochem Pharmacol*. 1 mars 2000;59(5):455-65.
109. Rinaldi E, Baggi F. LYVE-1 is « on stage » now: an emerging player in dendritic cell docking to lymphatic endothelial cells. *Cellular & Molecular Immunology* 2018 15:7. 27 nov 2017;15(7):663-5.

110. Menezes GB, McAvoy EF, Kubes P. Hyaluronan, platelets, and monocytes: a novel pro-inflammatory triad. *Am J Pathol.* 2009;174(6):1993-5.
111. De La Motte C, Nigro J, VasANJI A, Rho H, Kessler S, Bandyopadhyay S, et al. Platelet-derived hyaluronidase 2 cleaves hyaluronan into fragments that trigger monocyte-mediated production of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol.* 2009;174(6):2254-64.
112. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:435-61.
113. Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol.* 1 août 2008;18(4):288-95.
114. Bernert B, Porsch H, Heldin P. Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) Promotes Breast Cancer Cell Invasion by Suppression of Tissue Metalloproteinase Inhibitor 1 (TIMP-1). *Journal of Biological Chemistry.* 9 déc 2011;286(49):42349-59.
115. Okuda H, Kobayashi A, Xia B, Watabe M, Pai SK, Hirota S, et al. Hyaluronan synthase HAS2 promotes tumor progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer stem-like cells with macrophages and stromal cells. *Cancer Res.* 15 janv 2012;72(2):537-47.
116. Stern R. Hyaluronan Degradation in Tumor Growth and Metastasis. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* 2 mai 2004;16(89):171-85.
117. Ouhtit A, Abd Elmageed ZY, Abdraboh ME, Lioe TF, Raj MHG. In Vivo Evidence for the Role of CD44s in Promoting Breast Cancer Metastasis to the Liver. *Am J Pathol.* 1 déc 2007;171(6):2033-9.
118. Peng ST, Su CH, Kuo CC, Shaw CF, Wang HS. CD44 crosslinking-mediated matrix metalloproteinase-9 relocation in breast tumor cells leads to enhanced metastasis. *Int J Oncol.* 2007;31(5):1119-26.
119. Tzircotis G, Thorne RF, Isacke CM. Chemotaxis towards hyaluronan is dependent on CD44 expression and modulated by cell type variation in CD44-hyaluronan binding. *J Cell Sci.* 1 nov 2005;118(Pt 21):5119-28.
120. Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, Sugahara KN, Miyauchi T, Sako Y, et al. Engagement of CD44 Promotes Rac Activation and CD44 Cleavage during Tumor Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry.* 6 févr 2004;279(6):4541-50.
121. Bourguignon LYW, Singleton PA, Zhu H, Diedrich F. Hyaluronan-mediated CD44 Interaction with RhoGEF and Rho Kinase Promotes Grb2-associated Binder-1 Phosphorylation and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Leading to Cytokine (Macrophage-Colony Stimulating Factor) Production and Breast Tumor Progression. *Journal of Biological Chemistry.* 8 août 2003;278(32):29420-34.
122. Bourguignon LYW, Gilad E, Rothman K, Peyrollier K. Hyaluronan-CD44 Interaction with IQGAP1 Promotes Cdc42 and ERK Signaling, Leading to Actin Binding, Elk-1/Estrogen Receptor Transcriptional Activation, and Ovarian Cancer Progression. *Journal of Biological Chemistry.* 25 mars 2005;280(12):11961-72.
123. Yu H, Li Q, Zhou X, Kolosov VP, Perelman JM. Role of hyaluronan and CD44 in reactive oxygen species-induced mucus hypersecretion. *Mol Cell Biochem.* juin 2011;352(1-2):65-75.
124. Shiedlin A, Bigelow R, Christopher W, Arbabi S, Yang L, Maier R V., et al. Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules.* nov 2004;5(6):2122-7.

125. Rangaswamy V, Jain D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnol Lett.* mars 2008;30(3):493-6.
126. Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol.* janv 2005;66(4):341-51.
127. Armstrong DC, Johns MR. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(7):2759.
128. James W. Bracke, Kipling Thacker. Hyaluronic acid from bacterial culture - US4517295A [Internet]. Google Patent. United States; 1985 [cité 21 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US4517295>
129. David A. Swann, Bernard P. Sullivan, Gordon Jamieson, Kenneth R. Richardson, Tarlach Singh. Biosynthesis of hyaluronic acid - US4897349A [Internet]. Google Patent. 1990 [cité 21 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US4897349A/en?q=US4897349>
130. Derek C. Ellwood, Charles G. T. Evans, Geoffrey M. Dunn, Neil McInnes, Richard G. Yeo, Keith J. Smith. Production of hyaluronic acid - US5411874A [Internet]. Google Patent. 1995 [cité 21 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US5411874A/en>
131. Wikipédia. Chemostat [Internet]. [cité 21 mars 2024]. Disponible sur: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chemostat?oldid=1076021212>
132. Kim JH, Yoo SJ, Oh DK, Kweon YG, Park DW, Lee CH, et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microb Technol.* 1 nov 1996;19(6):440-5.
133. Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 13 janv 2005;66(4):341-51.
134. Sten Ståhl. Method and means for the production of hyaluronic acid - US6090596A [Internet]. Google Patent. 2000 [cité 22 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US6090596A/en>
135. Abraham Nimrod, Benjamin Greenman, Dov Kanner, Moshe Landsberg. High molecular weight sodium hyaluronate - US4784990A [Internet]. Google Patent. 1988 [cité 22 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US4784990A/en>
136. Abraham Nimrod, Benjamin Greenman, Dov Kanner, Moshe Landsberg, Yaffa Beck. Method of producing high molecular weight sodium hyaluronate by fermentation of streptococcus - US4780414A [Internet]. Google Patent. 1988 [cité 22 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US4780414A/en>
137. Sten Ståhl. Method and means for the production of hyaluronic acid - US6537795B1 [Internet]. Google Patent. 2003 [cité 22 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US6537795B1/en?q=US6537795B1>
138. DeAngelis PL, Papaconstantinou J, Weigel PH. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *Journal of Biological Chemistry.* 15 juill 1993;268(20):14568-71.
139. Widner B, Behr R, Von Dollen S, Tang M, Heu T, Sloma A, et al. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* juill 2005;71(7):3747-52.
140. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 20 nov 1997;390(6657):249-56.

141. Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab Eng.* janv 2008;10(1):24-32.
142. Mao Z, Chen RR. Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnol Prog.* sept 2007;23(5):1038-42.
143. Chien LJ, Lee CK. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* nov 2007;77(2):339-46.
144. Cheng F, Gong Q, Yu H, Stephanopoulos G. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol J.* 1 mars 2016;11(4):574-84.
145. Jing W, DeAngelis PL. Synchronized Chemoenzymatic Synthesis of Monodisperse Hyaluronan Polymers. *Journal of Biological Chemistry.* 1 oct 2004;279(40):42345-9.
146. Stefano Dr Carlino, Francois Magnette, Rene-Pierre Buenter. Procédé de purification de l'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé - CH692919A5 [Internet]. Google Patent. 2002 [cité 26 mars 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/CH692919A5/fr>
147. Fundarò SP, Salti G, Malgapo DMH, Innocenti S. The Rheology and Physicochemical Characteristics of Hyaluronic Acid Fillers: Their Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 10518. 10 sept 2022;23(18):10518.
148. Wongprasert P, Dreiss CA, Murray G. Evaluating hyaluronic acid dermal fillers: A critique of current characterization methods. *Dermatol Ther.* 1 juin 2022;35(6).
149. De Boulle K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez JX, et al. A Review of the Metabolism of 1,4-Butanediol Diglycidyl Ether–Crosslinked Hyaluronic Acid Dermal Fillers. *Dermatologic Surgery.* 1 déc 2013;39(12):1758-66.
150. Gilli R, Kacuráková M, Mathlouthi M, Navarini L, Paoletti S. FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. *Carbohydr Res.* 17 oct 1994;263(2):315-26.
151. Cael JJ, Isaac DH, Blackwell J, Koenig JL, Atkins EDT, Sheehan JK. Polarized infrared spectra of crystalline glycosaminoglycans. *Carbohydr Res.* 1 sept 1976;50(2):169-79.
152. Orr SFD. Infra-red spectroscopic studies of some polysaccharides. *Biochim Biophys Acta.* 1 janv 1954;14(C):173-81.
153. DISCHE Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry.* 1 janv 1947;167(1):189-98.
154. Nguyen NK, Nguyen HT, Le PH. Effects of *Lactobacillus casei* and Alterations in Fermentation Conditions on Biosynthesis of Glucuronic Acid by a *Dekkera bruxellensis*-*Gluconacetobacter intermedius* Kombucha Symbiosis Model System. *Food Biotechnol.* 1 janv 2015;29(4):356-70.
155. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem.* 1 oct 1962;4(4):330-4.
156. T. Cortier, V. Pateloup. Hydraulique : De la mécanique des fluides à la transmission de Puissance [Internet]. [cité 22 mars 2024]. Disponible sur: https://www.unilim.fr/pages_perso/thierry.cortier/Hydraulique_cours/co/Hydraulique_-_De_la_mecanique_des_fluides_a_la_transmission_de_Puissance_58.html
157. Wikipédia. Taux de cisaillement [Internet]. [cité 23 mars 2024]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/wiki/Taux_de_cisaillement

158. Bothner H, Wik O. Rheology of Hyaluronate. *Acta Otolaryngol.* 1987;104(S442):25-30.
159. Leith MM, Loftus SA, Kuo JW, DeVore DP, Keates EU. Comparison of the properties of AMVISC® and Healon®. *J Cataract Refract Surg.* 1 sept 1987;13(5):534-6.
160. Xometry. Shear Modulus: Definition, Values, and Examples [Internet]. [cité 24 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.xometry.com/resources/3d-printing/what-is-shear-modulus/>
161. Wikipédia. Module de cisaillement [Internet]. [cité 25 mars 2024]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/wiki/Module_de_cisaillement
162. Ruben Gerrit Scheuring. ResearchGate. 2018 [cité 25 mars 2024]. Rheology Definitions - Shear moduli vs Storage/Loss Moduli. Disponible sur: https://www.researchgate.net/post/Rheology_Definitions-Shear_moduli_vs_Storage_Loss_Moduli
163. TA Instruments. Rhéomètre Hybride Discovery [Internet]. [cité 24 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.tainstruments.com/wp-content/uploads/BROCH-DHR-FR.pdf>
164. OCDE. Ligne directrice n° 406 Sensibilisation de la peau Section 4. 2022 [cité 27 mars 2024]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1787/9789264070677-fr>
165. PrediTox. Mutagénicité - Test d'Ames [Internet]. [cité 27 mars 2024]. Disponible sur: <http://preditox.fr/service/mutagenicite/>
166. Wikipédia. Test d'Ames [Internet]. [cité 27 mars 2024]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/wiki/Test_d%27Ames
167. Eurolab. Détermination des endotoxines bactériennes (Pharmacopée européenne 2.6.14 Endotoxines bactériennes) [Internet]. [cité 28 mars 2024]. Disponible sur: [https://www.eurolab.net/fr/testler/farmasotik-testleri/bakteriyel-endotoksin-tayini-\(european-pharmacopoeia-2614-bacterial-endotoxins\)/](https://www.eurolab.net/fr/testler/farmasotik-testleri/bakteriyel-endotoksin-tayini-(european-pharmacopoeia-2614-bacterial-endotoxins)/)
168. Ramakrishna S, Tian L, Wang C, Liao S, Teo WE. Safety testing of a new medical device. *Medical Devices.* 1 janv 2015;137-53.
169. Code de la santé publique. Légifrance. [cité 29 mars 2024]. Article L5211-1. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000046126069
170. Ministère du travail de la santé et des solidarités. Les dispositifs médicaux (implants, prothèses...) [Internet]. [cité 29 mars 2024]. Disponible sur: <https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/autres-produits-de-sante/article/les-dispositifs-medicaux-implants-protheses>
171. Code de la santé publique. Légifrance. [cité 29 mars 2024]. Article L5111-1. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006689866/2000-06-22
172. Code de la santé publique. Légifrance. [cité 30 mars 2024]. Article L5131-1. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000028655292
173. Ramos-e-Silva M, Fonteles LA, Lagalhard CSX, Fucci-da-Costa APC. STYLAGE®: a range of hyaluronic acid dermal fillers containing mannitol. Physical properties and review of the literature. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 22 oct 2013;6:257.
174. Chang WH, Liu PY, Lin MH, Lu CJ, Chou HY, Nian CY, et al. Applications of Hyaluronic Acid in Ophthalmology and Contact Lenses. *Molecules.* 2021;26(9).

175. K L Goa, P Benfield. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* [Internet]. 1994 [cité 31 mars 2024];47(3):536-66. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7514978/>
176. Vivacy Paris. Laboratoires Vivacy [Internet]. [cité 31 mars 2024]. Disponible sur: <https://vivacy.com/fr/>
177. Swiss Medical Network. Arthrose du genou [Internet]. [cité 31 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.swissmedical.net/fr/orthopedie/chirurgie-genou/arthrose-genou>
178. OMS. Arthrose [Internet]. [cité 1 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/osteoarthritis>
179. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*. 1 mai 2007;80(21):1921-43.
180. L'Assurance Maladie. Ameli. 2023 [cité 31 mars 2024]. Le traitement de l'arthrose du genou. Disponible sur: https://www.ameli.fr/rhone/assure/sante/themes/arthrose-genou/traitement-medical-chirurgical#text_1592
181. Kopp S, Carlsson GE, Haraldson T, Wenneberg B. Long-term effect of intra-articular injections of sodium hyaluronate and corticosteroid on temporomandibular joint arthritis. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987;45(11):929-35.
182. Lohmander LS, Dalén N, Englund G, Hämäläinen M, Jensen EM, Karlsson K, et al. Intra-articular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomised, double blind, placebo controlled multicentre trial. Hyaluronan Multicentre Trial Group. *Ann Rheum Dis*. 1996;55(7):424-31.
183. Castellacci E, Polieri T. Antalgic effect and clinical tolerability of hyaluronic acid in patients with degenerative diseases of knee cartilage: an outpatient treatment survey. *Drugs Exp Clin Res*. 2004;30:67-73.
184. VIDAL. SYNVISCO sol inj [Internet]. [cité 1 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/parapharmacie/synvisco-sol-inj-58672.html>
185. VIDAL. Arthrose du genou : HYALGAN (acide hyaluronique) déremboursé à partir du 1er décembre 2017 [Internet]. [cité 1 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/actualites/22238-arthrose-du-genou-hyalgan-acide-hyaluronique-derembourse-a-partir-du-1er-decembre-2017.html>
186. HAS. Commission de la transparence - Avis du 19 Novembre 2014. 2014 [cité 1 avr 2024]; Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/evamed/CT-13286_HYALGAN_REEVAL_RI%20_CT13286_CT13796_Avis%203.pdf
187. VIDAL. HYALGAN 20 mg/2 ml sol inj en seringue préremplie pour voie intra-articulaire [Internet]. [cité 1 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/hyalgan-20-mg-2-ml-sol-inj-en-seringue-preremplie-pour-voie-intra-articulaire-8362.html>
188. HAS. Commission de la transparence - Avis du 22 Décembre 2004. 2004 [cité 1 avr 2024]; Disponible sur: <https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/ct031696.pdf>
189. Puisieux F, Seiller M, Devissaguet JP. Les systèmes de délivrance des médicaments : un réel progress pour la thérapeutique*. *Ann Pharm Fr*. 1 juill 2006;64(4):219-59.
190. Philip Dehayza, Cheng Lu. Sodium hyaluronate microspheres - US20040127459A1 [Internet]. Google Patent. 2004 [cité 1 avr 2024]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US20040127459A1/en>
191. Segura T, Chung PH, Shea LD. DNA delivery from hyaluronic acid-collagen hydrogels via a substrate-mediated approach. *Biomaterials*. mai 2005;26(13):1575.

192. Huang G, Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv.* 2018;25(1):766.
193. Juhaščík M, Kováčik A, Huerta-Ángeles G. Recent Advances of Hyaluronan for Skin Delivery: From Structure to Fabrication Strategies and Applications. *Polymers (Basel)*. 1 nov 2022;14(22):4833.
194. Juncan AM, Moisă DG, Santini A, Morgovan C, Rus LL, Vonica-țincu AL, et al. Advantages of Hyaluronic Acid and Its Combination with Other Bioactive Ingredients in Cosmeceuticals. *Molecules [Internet]*. 1 août 2021 [cité 1 avr 2024];26(15). Disponible sur: [/pmc/articles/PMC8347214/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/347214/)
195. Schiraldi C, Gatta A La, Rosa M De, Schiraldi C, Gatta A La, Rosa M De. Biopolymers. *IntechOpen*; 2010 [cité 1 avr 2024]. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.5772/10271>
196. Essendoubi M, Gobinet C, Reynaud R, Angiboust JF, Manfait M, Piot O. Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy. *Skin Research and Technology*. 1 févr 2016;22(1):55-62.
197. ANSM. Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication. [cité 29 mars 2024]; Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
198. OPCE. Journal officiel de l'Union Européenne. [cité 30 mars 2024]. Règlement (UE) 2017/745 du parlement européen et du conseil. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R0745>
199. Wikipédia. Poly Implant Prothèse [Internet]. [cité 29 mars 2024]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/wiki/Poly_Implant_Proth%C3%A8se
200. ANSM. Implants mammaires PIP pré-remplis de gel de silicone [Internet]. [cité 29 mars 2024]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/dossiers-thematiques/implants-mammaires-pip-pre-remplis-de-gel-de-silicone>
201. Eur-Lex. Eur-Lex. [cité 29 mars 2024]. Règlement (UE) 2017/745 du parlement européen et du conseil du 5 avril 2017. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745>
202. OPCE. Journal officiel de l'Union Européenne. [cité 30 mars 2024]. Règlement (CE) n° 726/2004 du parlement européen et du conseil. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02004R0726-20220128>
203. OPCE. Journal officiel de l'Union Européenne. [cité 30 mars 2024]. Règlement (CE) n° 1901/2006 du parlement européen et du conseil. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006R1901>
204. OPCE. Journal officiel de l'Union Européenne. [cité 30 mars 2024]. Règlement (UE) n° 536/2014 du parlement européen et du conseil. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32014R0536>
205. OPCE. Journal officiel de l'Union Européenne. [cité 30 mars 2024]. Règlement (CE) n° 1223/2009 du parlement européen et du conseil. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:02009R1223-20231201>
206. EUR-Lex. Règlement - 1223/2009 - EN - cosmétique [Internet]. [cité 30 mars 2024]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>

207. Dionne RA, Gordon SM, Moore PA. Prescribing Opioid Analgesics for Acute Dental Pain: Time to Change Clinical Practices in Response to Evidence and Misperceptions. Vol. 37, Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, N.J. : 1995). Compend Contin Educ Dent; 2016.
208. Brown LJ, Løe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1993;2(1):57-71.
209. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 11 nov 2014;93(11):1045-53.
210. Dr. Jean Jacques Edderai. Parodontologie : Les maladies des gencives [Internet]. [cité 2 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.northmiamibeachdentist.com/fr/parodontologie-les-maladies-des-gencives-2/>
211. Ma santé bucco-dentaire. Qu'est-ce qu'une pulpite dentaire ? [Internet]. [cité 2 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.lecourrierdudentiste.com/lepatient/vos-questions/quest-ce-quune-pulpite-dentaire.html>
212. Van Dyke TE. Control of inflammation and periodontitis. *Periodontol* 2000. oct 2007;45(1):158-66.
213. Serhan CN. Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB Journal*. 1 avr 2017;31(4):1273-88.
214. Gibon E, Lu LY, Nathan K, Goodman SB. Inflammation, ageing, and bone regeneration. *J Orthop Translat*. 1 juill 2017;10:28-35.
215. Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK, Mikos AG. Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 1 déc 2011;17(6):393-402.
216. Gu B, Kaneko T, Zaw SYM, Sone PP, Murano H, Sueyama Y, et al. Macrophage populations show an M1-to-M2 transition in an experimental model of coronal pulp tissue engineering with mesenchymal stem cells. *Int Endod J*. 1 avr 2019;52(4):504-14.
217. PubChem. lipoxin A4 [Internet]. [cité 2 avr 2024]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280914>
218. Samhan-Arias A, Aureliano M, Lopez-Sanchez C, Ortiz-Placín C, Castillejo-Rufo A, Estarás M, et al. Membrane Lipid Derivatives: Roles of Arachidonic Acid and Its Metabolites in Pancreatic Physiology and Pathophysiology. *Molecules* 2023, Vol 28, Page 4316. 24 mai 2023;28(11):4316.
219. Maderna P, Godson C. Lipoxins: Resolutionary road. *Br J Pharmacol*. oct 2009;158(4):947-59.
220. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol*. 1 mai 2015;27(3):200-15.
221. Aliberti J, Hieny S, Reis Sousa C, Serhan CN, Sher A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: A mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat Immunol*. 2002;3(1):76-82.
222. Ramon S, Bancos S, Serhan CN, Phipps RP. Lipoxin A4 modulates adaptive immunity by decreasing memory B-cell responses via an ALX/FPR2-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. févr 2014;44(2):357-69.
223. Jaén RI, Sánchez-García S, Fernández-Velasco M, Boscá L, Prieto P. Resolution-Based Therapies: The Potential of Lipoxins to Treat Human Diseases. *Front Immunol*. 23 avr 2021;12:1396.
224. Guo C, Sun L, Cai H, Duan Z, Zhang S, Gong Q, et al. Gadolinium-Labeled Biodegradable Dendron-Hyaluronic Acid Hybrid and Its Subsequent Application as a Safe and Efficient Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *ACS Appl Mater Interfaces*. 19 juill 2017;9(28):23508-19.

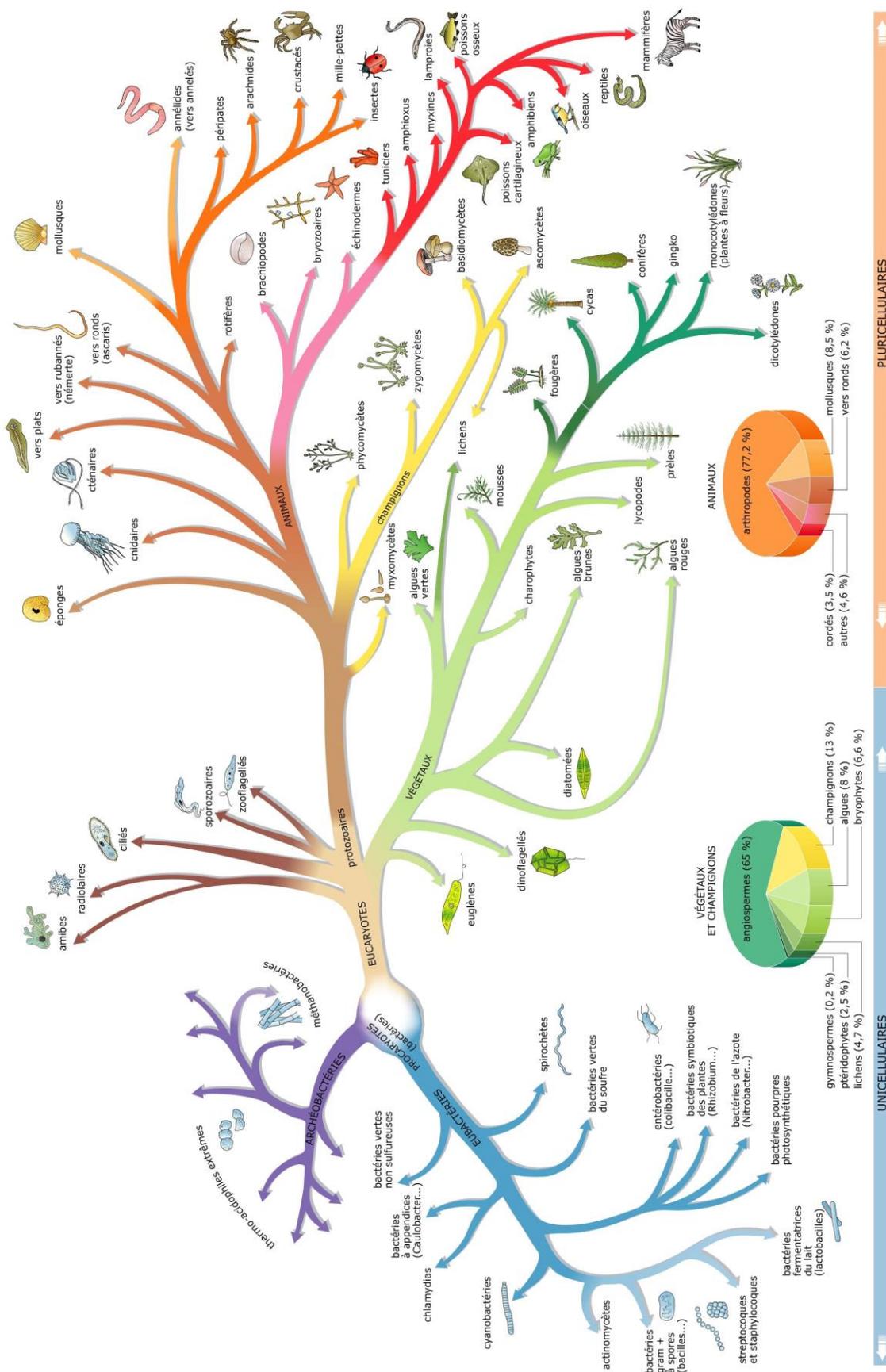
225. Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: A balancing act. *Journal of Biological Chemistry*. 15 févr 2002;277(7):4581-4.
226. Bian XH, Zhou GY, Wang LN, Ma JF, Fan QL, Liu N, et al. The role of CD44-hyaluronic acid interaction in exogenous Mesenchymal stem cells homing to rat remnant Kidney. *Kidney Blood Press Res*. 2014;38(1):11-20.
227. Litwiniuk M, Krejner A, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds*. 1 mars 2016;28(3):78-88.
228. Flegeau K, Toquet C, Rethore G, d'Arros C, Messenger L, Halgand B, et al. In Situ Forming, Silanized Hyaluronic Acid Hydrogels with Fine Control Over Mechanical Properties and In Vivo Degradation for Tissue Engineering Applications. *Adv Healthc Mater*. 1 oct 2020;9(19):2000981.
229. Simões S, Figueiras A, Veiga F. Modular Hydrogels for Drug Delivery. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2012;3:185-99.
230. Chemical Book. Polysorbate 20 [Internet]. [cité 15 avr 2024]. Disponible sur: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB3462544_EN.htm
231. Quinten T, Beer T De, Vervaet C, Remon JP. Evaluation of injection moulding as a pharmaceutical technology to produce matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm*. janv 2009;71(1):145-54.
232. FisherScientific. RPM / RCF Calculator [Internet]. [cité 5 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.fishersci.fr/fr/scientific-products/centrifuge-guide/centrifuge-applications-tools/rpm-rcf-calculator.html>
233. Chen WN, Shaikh MF, Bhuvanendran S, Date A, Ansari MT, Radhakrishnan AK, et al. Poloxamer 188 (P188), A Potential Polymeric Protective Agent for Central Nervous System Disorders: A Systematic Review. *Curr Neuropharmacol*. 2 juin 2022;20(4):799-808.
234. Bollenbach L, Buske J, Mäder K, Garidel P. Poloxamer 188 as surfactant in biological formulations – An alternative for polysorbate 20/80? *Int J Pharm*. 25 mai 2022;620:121706.
235. Défarge C, Lssa OM, Trichet J. Apports du cryo-microscope électronique à balayage à émission de champ à l'étude des matières organiques et des relations organo-minérales naturelles. Application aux croûtes microbiotiques des sols. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*. 15 mai 1999;328(9):591-7.
236. Zayed M, Tourne-Peteilh C, Ramonda M, Rethore G, Weiss P, Martinez J, et al. Microgels of silylated HPMC as a multimodal system for drug co-encapsulation. *Int J Pharm*. 2017;532(2):790-801.
237. Guyon L, Tessier S, Croyal M, Gourdel M, Lafont M, Segeron F, et al. Influence of physico-chemical properties of two lipoxin emulsion-loaded hydrogels on pre-polarized macrophages: a comparative analysis. *Drug Deliv Transl Res*. 2024;
238. Inyang E, Abhyankar V, Chen B, Cho M. Modulation of in vitro Brain Endothelium by Mechanical Trauma: Structural and Functional Restoration by Poloxamer 188. *Sci Rep*. 1 déc 2020;10(1):59888-90.
239. Linke A, Linke T, Hinrichs J, Kohlus R. Factors determining the surface oil concentration of encapsulated lipid particles—impact of the spray drying conditions. *Drying Technology*. 2021;39(2):173-86.
240. Li X, Li X, Yang J, Du Y, Chen L, Zhao G, et al. In Situ Sustained Macrophage-Targeted Nanomicelle–Hydrogel Microspheres for Inhibiting Osteoarthritis. *Research [Internet]*. janv 2023 [cité 8 avr 2024];6. Disponible sur: </pmc/articles/PMC10202383/>

241. Stern R, Kogan G, Jedrzejak MJ, Šoltés L. The many ways to cleave hyaluronan. Vol. 25, *Biotechnology Advances*. 2007. p. 537-57.
242. Kobayashi T, Chanmee T, Itano N. Hyaluronan: Metabolism and function. Vol. 10, *Biomolecules*. MDPI AG; 2020. p. 1-20.
243. Pandey MS, Baggenstoss BA, Washburn J, Harris EN, Weigel PH. The Hyaluronan Receptor for Endocytosis (HARE) Activates NF- κ B-mediated Gene Expression in Response to 40–400-kDa, but Not Smaller or Larger, Hyaluronans. *J Biol Chem* [Internet]. 5 mai 2013 [cité 12 avr 2024];288(20):14068. Disponible sur: [/pmc/articles/PMC3656264/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23811111/)
244. Stern R, Jedrzejak MJ. The Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chem Rev*. mars 2006;106(3):818.
245. Sliadovskii D, Ponomareva T, Molchanov M, Pozdnyakova-Filatova I, Timchenko M, Marchenkov V, et al. β -elimination of hyaluronate by red king crab hyaluronidase. *Sci Rep*. 19 nov 2021;11(1):22600-71.
246. ANSM. Importation de hyaluronidase pour le traitement des embolisations vasculaires lors de l'injection d'acide hyaluronique [Internet]. [cité 10 avr 2024]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/informations-de-securite/importation-de-hyaluronidase-pour-le-traitement-des-embolisations-vasculaires-lors-de-linjection-dacide-hyaluronique>
247. Flégeau K, Jing J, Brusini R, Gallet M, Moreno C, Walker L, et al. Multidose Hyaluronidase Administration as an Optimal Procedure to Degrade Resilient Hyaluronic Acid Soft Tissue Fillers. *Molecules*. 1 févr 2023;28(3).
248. Kuhn RJ, Eytting S, Henniges F, Potthoff A. In Vitro Comparison of Physical Parameters, Enzyme Activity, Acid Resistance, and pH Dissolution Characteristics of Enteric-Coated Pancreatic Enzyme Preparations: Implications for Clinical Variability and Pharmacy Substitution. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 1 janv 2007;12(2):115.
249. UPBM. Enzymologie et unités [Internet]. [cité 10 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.upbm.org/site-association/vie-associative/cela-fait-debat/enzymologie-et-unites>
250. Wikipédia. Enzyme unit [Internet]. [cité 10 avr 2024]. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_unit
251. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Units of Enzyme Activity. *Eur J Biochem*. 1 juill 1979;97(2):319-20.
252. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. *Free Radicals in Biology and Medicine* 3rd ed. 1999;1-139.
253. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JPL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 1 oct 2003;11(10):747-55.
254. Šoltés L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovská M, Arnhold J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules*. mars 2006;7(3):659-68.
255. Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr Med Chem*. 23 mars 2003;10(20):2123-45.
256. Arnhold J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)*. 2004;69(1):4-9.
257. Edwards SW, Hughes V, Barlow J, Bucknall R. Immunological detection of myeloperoxidase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem J*. 2 févr 1988;250(1):81.

258. Gutteridge JMC. Bleomycin-detectable iron in knee-joint synovial fluid from arthritic patients and its relationship to the extracellular antioxidant activities of caeruloplasmin, transferrin and lactoferrin. *Biochemical Journal*. 7 juill 1987;245(2):415.
259. Rees MD, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *Biochem J*. 1 juill 2004;381(Pt 1):175-84.
260. Rees MD, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-mediated fragmentation of hyaluronan, chondroitin sulfates, and related N-acetyl glycosamines: evidence for chloramide intermediates, free radical transfer reactions, and site-specific fragmentation. *J Am Chem Soc*. 12 nov 2003;125(45):13719-33.
261. Conrozier T, Mathieu P, Rinaudo M. Mannitol Preserves the Viscoelastic Properties of Hyaluronic Acid in an In Vitro Model of Oxidative Stress. *Rheumatol Ther*. 1 déc 2014;1(1):45-54.
262. Šoltés L, Stankovská M, Brezová V, Schiller J, Arnhold J, Kogan G, et al. Hyaluronan degradation by copper(II) chloride and ascorbate: rotational viscometric, EPR spin-trapping, and MALDI-TOF mass spectrometric investigations. *Carbohydr Res*. 11 déc 2006;341(17):2826-34.

ANNEXE I : CLASSIFICATION DES ESPECES VIVANTES

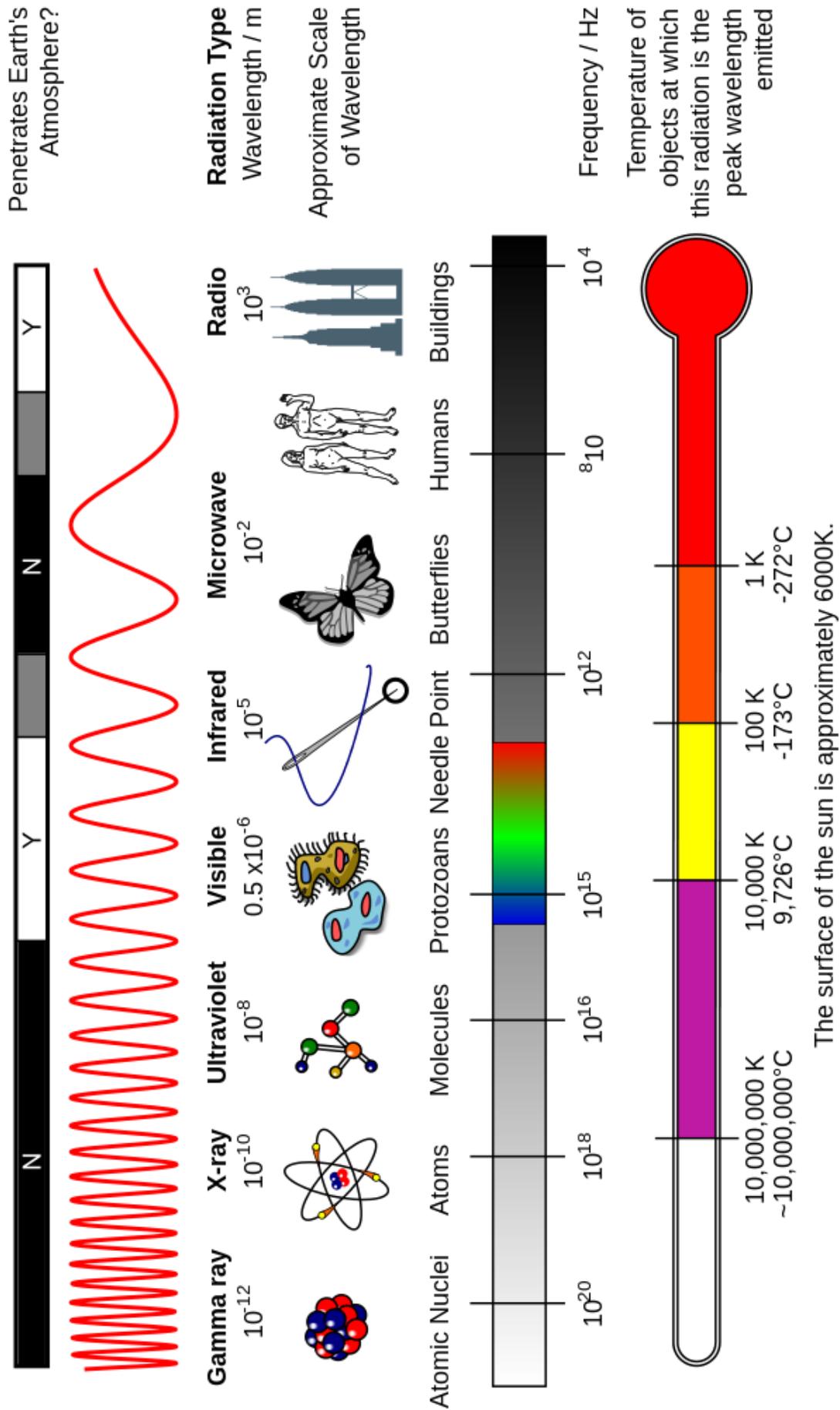
D'APRES L'ENCYCLOPÉDIE LAROUSSE



ANNEXE II : SYMBOL NOMENCLATURE FOR GLYCANS (SNFG)

SHAPE	White	Blue	Green	Yellow	Orange	Pink	Purple	Light Blue	Brown	Red
Filled Circle	Hexose 	Glc 	Man 	Gal 	Gul 	Alt 	All 	Tal 	Ido 	
Filled Square	HexNAC 	GlcNAC 	ManNAC 	GalNAC 	GulNAC 	AltNAC 	AlINAC 	TalNAC 	IdoNAC 	
Crossed Square	Hexosamine 	GlcN 	ManN 	GalN 	GulN 	AltN 	AlIN 	TalN 	IdoN 	
Divided Diamond	Hexuronate 	GlcA 	ManA 	GalA 	GulA 	AltA 	AlIA 	TalA 	IdoA 	
Filled Triangle	Deoxyhexose 	Qui 	Rha 		6dGul 	6dAlt 		6dTal 		Fuc 
Divided Triangle	DeoxyhexNAC 	QuiNAC 	RhaNAC 			6dAltNAC 		6dTalNAC 		FucNAC 
Flat Rectangle	Di-deoxyhexose 	Oli 	Tyv 		Abe 	Par 	Dig 	Col 		
Filled Star	Pentose 		Ara 	Lyx 	Xyl 	Rib 				
Filled Diamond	Deoxynonulosonate 		Kdn 				Neu5Ac 	Neu5Gc 	Neu 	Sia 
Flat Diamond	Di-deoxynonulosonate 		Pse 	Leg 		Aci 		4eLeg 		
Flat Hexagon	Unknown 	Bac 	LDManHep 	Kdo 	Dha 	DDManHep 	MurNAC 	MurNGc 	Mur 	
Pentagon	Assigned 	Api 	Fruc 	Tag 	Sor 	Psi 				

ANNEXE III : SPECTRE DES ONDES ÉLECTROMAGNÉTIQUES



MONOGRAPHIE DU HYALURONATE DE SODIUM

PHARMACOPÉE EUROPÉENNE 11.0

Sodium (hyaluronate de)

Sulfates (2.4.13) : au maximum 500 ppm.

Prélevez 3 mL de solution S et complétez à 15 mL avec de l'eau R.

Calcium : au maximum 100 ppm, si la substance à examiner est destinée à la fabrication de préparations parentérales.

Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (2.2.57).

Solution à examiner. Dissolvez 0,50 g de substance à examiner dans une solution d'acide nitrique R à 1 pour cent V/V et complétez à 50,0 mL avec la même solution.**Solutions de référence.** Préparez les solutions de référence à partir de la solution à 100 ppm de calcium (Ca) R en la diluant avec une solution d'acide nitrique R à 1 pour cent V/V.

Longueur d'onde : 396,8 nm.

Fer (2.4.9) : au maximum 20 ppm.

Prélevez 5 mL de solution S et complétez à 10 mL avec de l'eau R.

Eau (2.5.12) : 25,0 pour cent à 35,0 pour cent, déterminé sur 0,100 g de substance à examiner.

DOSAGE

Dissolvez 0,250 g de substance à examiner dans 30 mL d'eau R. Titrez par l'acide sulfurique 0,05 M. Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie (2.2.20) (n_1).

Calculez la teneur pour cent en glycérophosphate de sodium (substance anhydre) à l'aide de l'expression suivante :

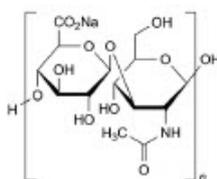
$$\frac{216,0 \left(n_1 - \frac{n_2}{4} \right)}{m (100 - a)}$$

 a = teneur pour cent en eau, n_1 = volume d'acide sulfurique 0,05 M utilisé dans le dosage, en millilitres, n_2 = volume d'acide chlorhydrique 0,1 M utilisé dans l'essai de l'alcalinité, en millilitres, m = masse de la prise d'essai, en grammes.

01/2023:1472

SODIUM (HYALURONATE DE)

Natrii hyaluronas

 $(C_{14}H_{23}NNaO_{11})_n$
[9067-32-7]

DÉFINITION

Sel sodique de l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane composé d'unités disaccharidiques formées d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine. L'hyaluronate de sodium est soit extrait de la crête de coq soit obtenu par fermentation au moyen de bactéries du genre *Streptococcus*, groupes Lancefield A et C.**Teneur** : 95,0 pour cent à 105,0 pour cent (substance desséchée).**Viscosité intrinsèque** : 90 pour cent à 120 pour cent de la valeur indiquée sur l'étiquette.

PRODUCTION

Le cas échéant, les animaux à partir desquels l'hyaluronate de sodium est obtenu répondent aux exigences de santé pour les animaux destinés à la consommation humaine.

Lorsque la production est effectuée par fermentation au moyen de bactéries gram-positives, il doit être démontré que le procédé utilisé permet de limiter ou d'éliminer les composants de la paroi cellulaire à caractère pyrogène ou inflammatoire.

CARACTÈRES

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche, très hygroscopique, ou agrégat fibreux.**Solubilité** : assez soluble ou soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'acétone et dans l'éthanol anhydre.

IDENTIFICATION

A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

Comparaison : spectre de référence de l'hyaluronate de sodium de la Ph. Eur.

B. L'hyaluronate de sodium donne la réaction (a) du sodium (2.3.1).

ESSAI

Solution S. Pesez une quantité d'hyaluronate de sodium équivalant à 0,10 g de substance desséchée et ajoutez 30,0 mL d'une solution à 9 g/L de chlorure de sodium R. Placez sous agitation modérée jusqu'à dissolution (environ 12 h).**Aspect de la solution.** La solution S est limpide (2.2.1) et son absorbance (2.2.25) à 600 nm est au maximum de 0,01.**pH (2.2.3)** : 5,0 à 8,5.

Dissolvez de l'hyaluronate de sodium dans de l'eau exempte de dioxyde de carbone R de façon à obtenir une solution contenant l'équivalent de 5 mg de substance desséchée par millilitre.

Viscosité intrinsèque. L'hyaluronate de sodium est très hygroscopique et doit être protégé de l'humidité au cours de la pesée.**Solution tampon (chlorure de sodium (0,15 M) dans de la solution tampon phosphate (0,01 M), pH 7,0).** Dissolvez 0,78 g de phosphate monosodique R et 4,50 g de chlorure de sodium R dans de l'eau R et complétez à 500,0 mL avec le même solvant (solution A). Dissolvez 1,79 g de phosphate disodique dodécahydraté R et 4,50 g de chlorure de sodium R dans de l'eau R et complétez à 500,0 mL avec le même solvant (solution B). Mélangez les solutions A et B jusqu'à obtention d'un pH de 7,0. Filtrez sur un filtre de verre fritté (4) (2.1.2).**Solution à examiner (a).** Pesez 0,200 g (m_{sp}) d'hyaluronate de sodium (NOTE : cette valeur n'est qu'indicative et doit être ajustée après la première mesure de viscosité de la solution à examiner (a)) et complétez avec 50,0 g (m_{ss}) de solution tampon à 4 °C. Homogénéisez en plaçant sous agitation à 4 °C pendant 24 h. Pesez 5,00 g (m_{1p}) de solution et complétez avec 100,0 g (m_{1s}) de solution tampon à 25 °C. Homogénéisez en plaçant sous agitation pendant 20 min. Filtrez sur un filtre de verre fritté (100) (2.1.2) et jetez les 10 premiers millilitres de filtrat.**Solution à examiner (b).** Pesez 30,0 g (m_{2p}) de solution à examiner (a) et complétez avec 10,0 g (m_{2s}) de solution tampon à 25 °C. Homogénéisez en plaçant sous agitation pendant 20 min. Filtrez sur un filtre de verre fritté (100) (2.1.2) et jetez les 10 premiers millilitres de filtrat.**Solution à examiner (c).** Pesez 20,0 g (m_{3p}) de solution à examiner (a) et complétez avec 20,0 g (m_{3s}) de solution tampon à 25 °C. Homogénéisez en plaçant sous agitation pendant 20 min. Filtrez sur un filtre de verre fritté (100) (2.1.2) et jetez les 10 premiers millilitres de filtrat.

Solution à examiner (d). Pesez 10,0 g (m_{4p}) de solution à examiner (a) et complétez avec 30,0 g (m_{4s}) de solution tampon à 25 °C. Homogénéisez en plaçant sous agitation pendant 20 min. Filtrez sur un filtre de verre fritté (100) (2.1.2) et jetez les 10 premiers millilitres de filtrat.

Déterminez le temps d'écoulement (2.2.9) de la solution tampon (t_0) et des 4 solutions à examiner (t_1 , t_2 , t_3 et t_4), à $25,00 \pm 0,03$ °C, en utilisant un viscosimètre à niveau suspendu approprié (spécifications : constante du viscosimètre d'environ $0,005 \text{ mm}^2/\text{s}^2$, plage de viscosité cinématique de $1-5 \text{ mm}^2/\text{s}$, diamètre intérieur du tube R de 0,53 mm, volume du réservoir C de 5,6 mL, diamètre intérieur du tube N de 2,8-3,2 mm), possédant un capillaire à extrémité inférieure en forme d'entonnoir. Utilisez le même viscosimètre pour toutes les mesures et effectuez chaque mesure en triple. L'essai n'est valable que si les résultats obtenus ne diffèrent pas de plus de 0,35 pour cent de la moyenne et si le temps d'écoulement t_1 n'est pas inférieur à 1,6 fois ni supérieur à 1,8 fois t_0 ($1,6 t_0 \leq t_1 \leq 1,8 t_0$). Si tel n'est pas le cas, ajustez la valeur de m_{4p} et répétez l'essai.

Calcul des viscosités relatives

Les solutions d'hyaluronate de sodium et le solvant étant de densité sensiblement égale, il est possible de calculer les viscosités relatives η_{rel} (soit η_{r1} , η_{r2} , η_{r3} et η_{r4}) à partir du rapport entre les temps d'écoulement t_i obtenus respectivement pour chacune des solutions (soit t_1 , t_2 , t_3 et t_4) et le temps d'écoulement t_0 obtenu pour le solvant, en appliquant une correction d'énergie cinétique liée au capillaire ($B = 30\,800 \text{ s}^3$), à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{t_i - \frac{B}{t_i^2}}{t_0 - \frac{B}{t_0^2}}$$

Calcul des concentrations

Calculez la concentration c_1 (exprimée en kg/m^3) d'hyaluronate de sodium dans la solution à examiner (a) à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{m_{op} \times x \times (100 - h) \times m_{1p} \times \rho_{25}}{100 \times 100 \times (m_{op} + m_{os}) \times (m_{1p} + m_{1s})}$$

x = teneur pour cent en hyaluronate de sodium déterminée dans le dosage,

h = perte à la dessiccation, en pour cent,

ρ_{25} = $1005 \text{ kg}/\text{m}^3$ (masse volumique de la solution à examiner à 25 °C).

Calculez la concentration c_2 (exprimée en kg/m^3) d'hyaluronate de sodium dans la solution à examiner (b) à l'aide de l'expression suivante :

$$c_1 \times \frac{m_{2p}}{m_{2s} + m_{2p}}$$

Calculez la concentration c_3 (exprimée en kg/m^3) d'hyaluronate de sodium dans la solution à examiner (c) à l'aide de l'expression suivante :

$$c_1 \times \frac{m_{3p}}{m_{3s} + m_{3p}}$$

Calculez la concentration c_4 (exprimée en kg/m^3) d'hyaluronate de sodium dans la solution à examiner (d) à l'aide de l'expression suivante :

$$c_1 \times \frac{m_{4p}}{m_{4s} + m_{4p}}$$

Calcul de la viscosité intrinsèque

Calculez la viscosité intrinsèque $[\eta]$ à partir de la droite de régression établie par la méthode des moindres carrés suivant l'équation de Martin :

$$\log_{10} \left(\frac{\eta_r - 1}{c} \right) = \log_{10} [\eta] + k [\eta] c$$

L'antilogarithme décimal de l'ordonnée à l'origine est la viscosité intrinsèque, exprimée en m^3/kg .

Glycosaminoglycannes sulfatés : au maximum 1 pour cent, si l'hyaluronate de sodium est obtenu par extraction à partir de crête de coq.

Pour des raisons de sécurité, la manipulation de l'acide perchlorique à température élevée exige des précautions appropriées.

Solution à examiner. Dans un tube à essai de 150 mm de longueur et d'un diamètre intérieur de 16 mm, introduisez une quantité d'hyaluronate de sodium équivalant à 50,0 mg de substance desséchée et dissolvez dans 1,0 mL d'acide perchlorique R.

Solution témoin. Dissolvez 0,149 g de sulfate de sodium anhydre R dans de l'eau R et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'eau R. Transférez 1,0 mL de cette solution dans un tube à essai de 150 mm de longueur et d'un diamètre intérieur de 16 mm et évaporez dans un bloc chauffant à 90-95 °C, puis dissolvez le résidu dans 1,0 mL d'acide perchlorique R.

Bouchez tous les tubes avec de la laine de verre. Placez-les dans un bloc chauffant ou un bain d'huile de silicone maintenu à 180 °C et chauffez jusqu'à obtention de solutions incolores limpides (environ 12 h). Sortez les tubes et refroidissez-les à température ambiante. Ajoutez dans chaque tube 3,0 mL d'une solution à 33,3 g/L de chlorure de baryum R, bouchez et agitez énergiquement. Laissez reposer pendant 30 min, puis agitez à nouveau chaque tube et mesurez l'absorbance (2.2.25) à 660 nm, par comparaison à de l'eau R.

L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à l'absorbance de la solution témoin.

Acides nucléiques. L'absorbance (2.2.25) de la solution S à 260 nm est au maximum de 0,5.

Protéines : au maximum 0,3 pour cent ; au maximum 0,1 pour cent si l'hyaluronate de sodium est destiné à la fabrication de préparations parentérales.

Solution à examiner (a). Dissolvez de l'hyaluronate de sodium dans de l'eau R de façon à obtenir une solution contenant une quantité d'hyaluronate de sodium équivalant à environ 10 mg de substance desséchée par millilitre.

Solution à examiner (b). Préparez un mélange à volumes égaux de solution à examiner (a) et d'eau R.

Solutions de référence. Préparez une solution mère à 0,5 mg/mL d'albumine bovine R dans de l'eau R. A partir de cette solution, préparez 5 dilutions en série contenant de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'albumine bovine R.

Ajoutez 2,5 mL de solution cupri-tartrique R3 récemment préparée dans des tubes à essai contenant respectivement 2,5 mL d'eau R (blanc), 2,5 mL de solution à examiner (a) et 2,5 mL de solution à examiner (b), ainsi que dans des tubes à essai contenant 2,5 mL de chacune des dilutions de la série de solutions de référence préparées comme décrit ci-dessus. Homogénéisez après chaque addition. Après environ 10 min, ajoutez dans chaque tube 0,50 mL d'un mélange à volumes égaux de réactif phosphomolybdotungstique R et d'eau R préparé immédiatement avant l'emploi, en homogénéisant après chaque addition. Après 30 min, mesurez l'absorbance (2.2.25) de chaque solution à 750 nm par comparaison au blanc. A partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec les 5 solutions de référence, calculez la teneur en protéines des solutions à examiner (a) et (b).

Chlorures (2.4.4) : au maximum 0,5 pour cent.

Dissolvez 67 mg d'hyaluronate de sodium dans 100 mL d'eau R.

Fer : au maximum 80 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (2.2.23, Procédé II).

Solution à examiner. Dissolvez une quantité d'hyaluronate de sodium équivalent à 0,25 g de substance desséchée dans 1 mL d'acide nitrique R, en chauffant au bain-marie. Refroidissez et complétez à 10,0 mL avec de l'eau R.

Solutions de référence. Préparez 2 solutions de référence de la même manière que la solution à examiner, mais en ajoutant respectivement 1,0 mL et 2,0 mL de solution à 10 ppm de fer (Fe) R après dissolution de l'hyaluronate de sodium.

Source : lampe à cathode creuse au fer en utilisant une largeur de fente spectrale de 0,2 nm.

Longueur d'onde : 248,3 nm.

Dispositif d'atomisation : flamme air-acétylène.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 20,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 100-110 °C sur du pentoxyde de diphosphore R pendant 6 h sur 0,500 g d'hyaluronate de sodium.

Contamination microbienne

DGAT : critère d'acceptation 10² UFC/g (2.6.12). Effectuez l'essai sur 1 g d'hyaluronate de sodium.

Endotoxines bactériennes (2.6.14) : moins de 0,5 UI/mg, si l'hyaluronate de sodium est destiné à la fabrication de préparations parentérales sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes ; moins de 0,05 UI/mg, si l'hyaluronate de sodium est destiné à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie intraoculaire ou intra-articulaire sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

DOSAGE

Déterminez la teneur en acide glucuronique après réaction avec le carbazol comme décrit ci-après.

Réactif A. Dissolvez 0,95 g de tétraborate de disodium R dans 100,0 mL d'acide sulfurique R.

Réactif B. Dissolvez 0,125 g de carbazol R dans 100,0 mL d'éthanol anhydre R.

Solution à examiner. Préparez cette solution en triple. Dissolvez 0,170 g d'hyaluronate de sodium dans de l'eau R et complétez à 100,0 g avec le même solvant. Prélevez 10,0 g de cette solution et complétez à 200,0 g avec de l'eau R.

Solution mère de référence. Dissolvez dans de l'eau R 0,100 g d'acide D-glucuronique R, préalablement desséché à masse constante sous vide sur du pentoxyde de diphosphore R (2.2.32), et complétez à 100,0 g avec le même solvant.

Solutions de référence. Préparez 5 dilutions de la solution mère de référence, de teneur en acide D-glucuronique R allant de 6,5 µg/g à 65 µg/g.

Placez dans de l'eau glacée 25 tubes à essai numérotés de 1 à 25. Introduisez dans des tubes séparés, à raison de 3 tubes par solution, 1,0 mL des 5 solutions de référence (tubes 1 à 15) et 1,0 mL des 3 solutions à examiner (tubes 16 à 24) ; dans le tube 25, placez 1,0 mL d'eau R (blanc). Ajoutez dans chaque tube 5,0 mL de réactif A récemment préparé et préalablement refroidi dans de l'eau glacée. Fermez hermétiquement les tubes avec des capuchons de plastique, agitez, et placez au bain-marie pendant exactement 15 min. Refroidissez dans de l'eau glacée, puis ajoutez dans chaque tube 0,20 mL de réactif B. Refermez les tubes, agitez et placez à nouveau au bain-marie pendant exactement 15 min. Refroidissez à température ambiante et mesurez l'absorbance (2.2.25) des solutions à 530 nm, par comparaison au blanc.

A partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec la moyenne des valeurs de l'absorbance lues pour chacune des solutions de référence, calculez la moyenne des teneurs en acide D-glucuronique des solutions à examiner.

Calculez la teneur pour cent en hyaluronate de sodium à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{c_g}{c_r} \times Z \times \frac{100}{100 - h} \times \frac{401,3}{194,1}$$

c_g = moyenne des concentrations d'acide D-glucuronique dans les solutions à examiner, en milligrammes par gramme,

c_r = moyenne des concentrations de substance à examiner dans les solutions à examiner, en milligrammes par gramme,

Z = teneur pour cent (déterminée) en C₆H₁₀O₇ de l'acide D-glucuronique R,

h = perte à la dessiccation, en pour cent,

401,3 = masse moléculaire relative d'une unité disaccharidique,

194,1 = masse moléculaire relative de l'acide glucuronique.

CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Si la substance est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la viscosité intrinsèque,
- l'origine de la substance,
- l'utilisation prévue de la substance,
- dans les cas appropriés, que la substance est appropriée à l'administration parentérale à l'exclusion de la voie intra-articulaire,
- dans les cas appropriés, que la substance est appropriée à l'administration parentérale y compris la voie intra-articulaire,
- dans les cas appropriés, que la substance est appropriée à l'administration par voie intraoculaire.

01/2017:0677



SODIUM (HYDROXYDE DE)

Natrii hydroxidum

NaOH
[1310-73-2]

M_r 40,00

DÉFINITION

Teneur : 97,0 pour cent à 100,5 pour cent.

CARACTÈRES

Aspect : masses cristallines, blanches ou sensiblement blanches, présentées sous forme de pastilles, de cylindres ou de plaques, déliquescentes, absorbant facilement le dioxyde de carbone.

Solubilité : très soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

IDENTIFICATION

A. pH (2.2.3) : au minimum 11,0.

Dissolvez 0,1 g d'hydroxyde de sodium dans 10 mL d'eau R. Prélevez 1 mL de solution et complétez à 100 mL avec de l'eau R.

B. 2 mL de solution S (voir Essai) donnent la réaction (a) du sodium (2.3.1).

ANNEXE V : LISTE DES PRODUITS INJECTABLES DE COMPLEMENT DES RIDES DECLARES EN FRANCE



Agence nationale de sécurité du médicament
et des produits de santé

LISTE DES PRODUITS INJECTABLES DE COMPLEMENT DES RIDES DECLARES EN FRANCE (31 juillet 2012).				
Les produits suivants sont indiqués dans le comblement des rides du visage.				
*R: résorbable (3-6 mois), LR: lentement résorbable (6-24 mois), NR: non résorbable (définitif)				
Dénomination commerciale	Fabricant	Composition	*R-LR-NR	Date de déclaration à l'Afssaps
RESORBABLE < 6 mois				
AcHyal®	TEDEC-MEIJ I FARMA SA	acide hyaluronique	R	13/06/2005
Acide hyaluronique HYALURONICA-1-®	Vital Esthétique	acide hyaluronique	R	19/10/2009
Acide hyaluronique HYALURONICA-2-®	Vital Esthétique	acide hyaluronique	R	19/10/2009
DERMYAL 18®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	09/06/2009
DERMYAL 24R®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	09/06/2009
DERMYAL 32HR®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	09/06/2009
ESTHELIS SOFT	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	12/05/2010
ESTHELIS BASIC	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	12/05/2010
GLYSTONE Professional 2® Rides superficielles	Pierre Fabre Dermo- Cosmetique	acide hyaluronique	R	15/05/2008
HYALUDERM 2%®	LCA Pharmaceutical	acide hyaluronique	R	03/08/2009
HYALUDERM 2,5%®	LCA Pharmaceutical	acide hyaluronique	R	03/08/2009
ISOGEL®class I, II, III	Laboratoires FILORGA	acide hyaluronique	R	10/10/2006
JOLIDERMIS 24®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	28/02/2009
JOLESS DEFINE	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	15/09/2010
JOLESS BALANCE	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	14/05/2010
JOLESS SOFT	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	15/09/2010
JOLIDERMIS 24+®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	12/05/2010
JOLIDERMIS 18®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	12/05/2010
JUVEDERM VOLBELLA with Lidocaïne	ALLERGAN	acide hyaluronique+lidocaïne	R	01/02/2012
JUVEDERM VOLIFT with Lidocaïne	ALLERGAN	acide hyaluronique+lidocaïne	R	01/02/2012
LISSANT-YAL 1.6 %®	Laboratoires PHARMY 2	acide hyaluronique	R	14/09/2009
LISSANT-YAL 2.2 %®	Laboratoires PHARMY 2	acide hyaluronique	R	14/09/2009
M-HA18®	FILORGA	acide hyaluronique	R	02/04/2010
PREVELLE®	GENZYME Biosurgery	acide hyaluronique	R	13/02/2008
PRINCESS® Filler	CROMA GmbH	acide hyaluronique	R	02/12/2008
PRINCESS® RICH	CROMA GmbH	acide hyaluronique	R	02/06/2009
PURAGEN®	Mentor Biopolymers Ltd	acide hyaluronique	R	13/02/2008

RENOFILL Deeply Correction®	Laboratoires RENOPHASE	acide hyaluronique	R	28/05/2009
RENOFILL Perfectly Volume®	Laboratoires RENOPHASE	acide hyaluronique	R	28/05/2009
RENOFILL Softy Correction®	Laboratoires RENOPHASE	acide hyaluronique	R	28/05/2009
REVANESSE®	Prollenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
REVANESSE® Lips®	Prollenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
REVANESSE® Pure	Prollenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
REVANESSE® Ultra	Prollenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
R-FINE®	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	29/09/2006
Solution viscoélastique intradermique PRINCESS VOLUME®	CROMA GmbH	acide hyaluronique	R	16/10/2009
Succeev one®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	08/04/2010
Succeev two®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	08/04/2010
Succeev three®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	08/04/2010
SURGIDERM 18®	Allergan	acide hyaluronique	R	03/07/2008
VARIODERM MESOLIFT	ADODERM GMBH	acide hyaluronique	R	19/05/2010
VISAGEL®	SURGICAL Concepts GmbH	acide hyaluronique	R	23/03/2006
X-HA3®	Laboratoires FILORGA	acide hyaluronique	R	23/03/2009
X-HA volume®	Laboratoires FILORGA	acide hyaluronique	R	23/03/2009

LENTEMENT RESORBABLE >6 mois				
CONJONCTYL®	SEDIFA Laboratoires	Monomethyltrisilanol orthohydroxy benzoate de sodium	LR	24/05/2004
DERMAFILL Global	SBS-MED infinity cosmetics	acide hyaluronique	LR	06/07/2011
DERMAFILL VOLUME	SBS-MED infinity cosmetics	acide hyaluronique	LR	06/07/2011
EMERVEL classic	GALDERMA international	acide hyaluronique	LR	06/04/2010
EMERVEL classic lidocaïne	GALDERMA international	acide hyaluronique	LR	06/04/2010
EMERVEL Deep	GALDERMA international	acide hyaluronique	LR	06/04/2010
EMERVEL Deep lidocalne	GALDERMA international	acide hyaluronique	LR	06/04/2010
FORTELIS EXTRA®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	LR	28/02/2009
GLYTONE Professional 3® Rides moyennes profondes	Pierre Fabre Dermo-Cosmetique	acide hyaluronique	LR	15/05/2008
GLYTONE Professional 4® Volumes et dépressions profondes	Pierre Fabre Dermo-Cosmetique	acide hyaluronique	LR	25/08/2009
JUVEDERM ULTRA 3®	Allergan	acide hyaluronique	LR	26/12/2007
JUVEDERM ULTRA 4®	Allergan	acide hyaluronique	LR	26/12/2007
JUVEDERM® ULTRA SMILE®	Allergan	acide hyaluronique	LR	07/04/2008
Perfectha Derm® - PD	OBVIELINE	acide hyaluronique	LR	05/10/2007
Perfectha Derm® Deep - PDD	OBVIELINE	acide hyaluronique	LR	05/10/2007
Perfectha Derm® Fine Lines -	OBVIELINE	acide hyaluronique	LR	05/10/2007

PDFL				
RADIESSE®	MERZ Aesthetics Inc	hydroxyapatite de Calcium	LR	07/10/2010
REDEXIS®	Prollenium Medical Technologies Inc	Microbille de dextran+ Acide hyaluronique	LR	09/09/2009
Restylane Lidocaïne®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2009
Restylane Touch®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2005
Restylane®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2005
SCULPTRA®	SANOFI-AVENTIS S.p.A	acide polylactique	LR	06/12/2004
SKIN FILL carbonium	BOHÜS Biotech	acide hyaluronique	LR	11/11/2011
STYLAGE S 0,4ml®	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	03/10/2008
STYLAGE XL®	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	11/04/2008
STYLAGE® L	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	11/04/2008
STYLAGE® M	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	11/04/2008
Stylage® M Lidocaïne	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	25/01/2010
STYLAGE® S	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	11/04/2008
Stylage® S Lidocaïne	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	25/01/2010
Stylage® Special Lips	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	16/10/2008
Stylage® Spécial Lips Lidocaïne	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	LR	25/01/2010
SURGIDERM 24XP®	Allergan	acide hyaluronique	LR	03/07/2008
SURGIDERM 30®	Allergan	acide hyaluronique	LR	03/07/2008
SURGIDERM 30XP®	Allergan	acide hyaluronique	LR	03/07/2008
TEOSYAL 27G Deep Lines Single®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	29/03/2007
TEOSYAL 27G Deep Lines®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	18/05/2006
TEOSYAL 30G Global Action (2x1ml)®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	18/05/2006
TEOSYAL 30G Global Action Single (1ml)®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	29/03/2007
TEOSYAL 30G Touch Up®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	18/05/2006
TEOSYAL First Lines®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	18/05/2006
TEOSYAL Kiss Single®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	29/03/2007
TEOSYAL Kiss®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	18/05/2006
TEOSYAL Ultra Deep Single®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	29/03/2007
TEOSYAL Ultra Deep® (1mL) (1,2mL)	TEOXANE SA	acide hyaluronique	LR	18/05/2006
Teosyal PureSense First Lines	TEOXANE SA	acide hyaluronique+lidocaïne	LR	25/07/2011
Teosyal PureSense Global Action	TEOXANE SA	acide hyaluronique+lidocaïne	LR	25/07/2011
Teosyal PureSense Kiss	TEOXANE SA	acide hyaluronique+lidocaïne	LR	25/07/2011
Teosyal PureSense UltraDeep	TEOXANE SA	acide hyaluronique+lidocaïne	LR	25/07/2011
Teosyal PureSense DeepLines	TEOXANE SA	acide hyaluronique+lidocaïne	LR	25/07/2011
VARIODERM	ADODERM Gmbh	acide hyaluronique	LR	19/05/2010
VARIODERM plus	ADODERM Gmbh	acide hyaluronique	LR	19/05/2010
VARIODERM lips & medium	ADODERM Gmbh	acide hyaluronique	LR	19/05/2010

VARIODERM Fine Line	ADODERM Gmbh	acide hyaluronique	LR	19/05/2010
X-HA volume®	FILORGA	acide hyaluronique	LR	02/04/2010
NON RESORBABLE* , durée de présence définitive,				
* l'ANSM ne recommande pas leur utilisation (http://ansm.sante.fr/Dossiers-thematiques/Produits-injectables-de-comblement-des-rides/Principaux-risques-associes-aux-produits-injectables-de-comblement-des-rides/(offset)/5)				
AQUAMID®	COUNTURA Intle	polyacrylamide	NR	13/06/2005

Les produits suivants ne sont plus sur le marché français				
Dénomination commerciale	Fabricant	Composition	*R-LR-NR	Année d'arrêt de commercialisation
BIOSTYLE®	SUN COMMUNICATION	acide hyaluronique	LR	2011
HYALSKIN® MESOFACE REPARESTIM HA®	CHOC MEDICAL	acide hyaluronique	LR	2011
Zetaderm ®, Zetavisc ®, Philoderm Professional Mesoface ®	PHILODERM AESTHETICS	acide hyaluronique	LR	2011
AMALIAN®	S&V technologies AG	acide hyaluronique	R	2011
NOVABEL®	MERZ Pharmaceuticals GmbH	alginate	LR	2010
JOLIESSE®, JOLIESSE plus®	France LENS	acide hyaluronique	R	2010
EVOLENCE®	COLBAR Lifscience	collagène porcin	LR	2009
EVOLUTION®	PROCYTECH	Polymères acryliques (polyacrylamide)	NR	2008
NOVASOFT®	ADODERM Gmbh	acide hyaluronique + Particules Polymères (poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle-co-méthacrylate d'éthyle) (PHEMA-co-EMA)	NR	2008
DERMALIVE/DERMADEEP ®	DERMATECH	acide hyaluronique + Particules Polymères (poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle-co-méthacrylate d'éthyle) (PHEMA-co-EMA)	NR	2007
OUTLINE Fine/OUTLINE Original/OUTLINE Ultra	PROCYTECH	polyacrylamide modifié	LR	2007



Serment de Galien

*En présence des Maîtres de cette
Faculté et de mes Condisciples,*

je promets et je jure :

D'être fidèle dans l'exercice de la Pharmacie
aux lois de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

d'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt
de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité
et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état
pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels ;

de ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés
ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes
de mon art et de rester digne de leurs enseignements.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.



RÉSUMÉ

L'acide hyaluronique (AH), découvert initialement par Karl Meyer et John Palmer dans l'humeur vitrée de l'œil bovin, est une molécule connue depuis le XX^{ème} siècle. Son identification chez les eucaryotes s'est ensuite élargie et l'étude de ses fonctions biologiques ainsi que sa caractérisation ont permis le développement de nouvelles applications. Notamment dans le domaine de l'esthétique mais aussi de la cosmétique. Sa présence chez les procaryotes et le développement des biotechnologies ont permis un progrès considérable pour sa production en permettant d'assurer sa qualité, d'augmenter les rendements de production et d'obtenir des polymères de haut poids moléculaire. Ces avancées permettent également à l'AH de mieux se conformer aux réglementations des divers domaines auxquels il peut être associé.

Grâce à ses propriétés hygroscopique, de fluide viscoélastique et de matériau pseudoplastique, l'AH représente un outil d'intérêt en santé pour la production de solutions visqueuses ou d'hydrogels. Ces produits sont facilement modifiables chimiquement par des techniques de réticulation. Les hydrogels constituent un outil de recherche d'actualité notamment comme système de délivrance de substances actives. De tels systèmes sont capables d'encapsuler différents éléments : molécule, matériel génétique, cellule. Le contrôle de leur dégradation par les hyaluronidases (HYAL), espèces réactives de l'oxygène (ROS) et autres facteurs permet à la fois de libérer progressivement leur contenu mais aussi de le protéger de ces facteurs de dégradation.

Le rôle de l'AH dans le domaine de la santé ne cesse de s'accroître, et de nouvelles applications pour ce polymère restent encore à explorer.

Mots clés : ACIDE HYALURONIQUE, BIOTECHNOLOGIES, FONCTIONS BIOLOGIQUES, APPLICATIONS, PRODUCTION, QUALITE, DEGRADATION.