

Mémoire de Maîtrise en Médecine n°5583

Évaluation de la formulation d'un gel à base de HA et de cellules progénitrices fœtales pour le traitement topique des brûlures

*Evaluation of a formulation of an HA-based gel with fetal
progenitor cells for topical treatment of burn wounds.*

Étudiante

Chiara Carlino

Tutrice

Prof. Lee Ann Laurent-Applegate

Co-tutrice

Dre. Nathalie Hirt-Burri

Expert

Dr. Anthony de Buys Roessingh

Lausanne, le 05.12.2018

Remerciements

La réalisation de ce travail de master a été possible grâce au concours de plusieurs personnes que je tiens à remercier.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement ma tutrice la Prof Lee Ann Laurent-Applegate pour l'opportunité accordée de travailler au sein de l'Unité de Thérapie Régénérative (UTR, CHUV), pour sa disponibilité, son encadrement et sa gentillesse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma co-tutrice la Dre Nathalie Hirt-Burri pour m'avoir suivie avec attention le long de mon parcours, pour sa patience, sa grande disponibilité et ses précieux conseils.

J'adresse mes remerciements également à toutes les personnes de l'Unité de Thérapie Régénérative qui m'ont accueillie dans leur équipe. Je remercie en particulier Madame Catherine Pythoud, technicienne de laboratoire, qui s'est engagée à m'accompagner lors de mes expériences.

Je tiens à remercier spécialement mon père, le Dr Stefano Carlino, chercheur avec une expérience dans l'acide hyaluronique depuis 30 ans, qui m'a inspirée, soutenue et aidée le long de mon parcours de découverte de ce merveilleux polymère.

Enfin, je remercie le reste de mes proches pour leur encouragement et leur précieux soutien.

Résumé

Les brûlures de 2ème degré profond et 3ème degré engendrent des perturbations cutanées, telles une mauvaise oxygénation tissulaire ou une perte de liquide et de protéines. Le risque de déshydratation et d'infections est donc prévenu dans les centres suisses de grands brûlés par l'application d'une couverture précoce appelée "pansement biologique". Il s'agit d'une matrice biodégradable, principalement à base de collagène dans la pratique quotidienne, contenant des cellules progénitrices de peau fœtaleensemencées.

Ce travail a pour but d'évaluer la faisabilité du point de vue théorique et en partie pratique d'un nouveau type de pansement biologique sous forme de gel à base d'acide hyaluronique et de cellules progénitrices fœtales. L'acide hyaluronique (HA) est un biopolymère naturellement présent dans le derme et dont les propriétés sont précieuses pour la régénération cutanée. De plus, l'application d'un pansement biologique sous forme de gel permettrait de bénéficier des bienfaits des hydrogels et de faciliter son application par les chirurgiens.

Dans un premier temps, l'analyse bibliographique a révélé les nombreux avantages de l'acide hyaluronique et les multiples études qui démontrent ses bénéfices chez les grands brûlés.

Puis, une partie expérimentale a été effectuée afin de tester la tolérance des cellules progénitrices fœtales au contact avec différentes concentrations d'acide hyaluronique. Les résultats posent les bases et encouragent l'exécution de futures expériences à ce sujet.

Liste des abréviations

AFS	Amniotic Fluid derived Stem cells (<i>cellules souches amniotiques</i>)
CPF	Cellules Progénitrices Fœtales
DA, kDA	DAAlton, KiloDAAlton
DCM	DeCellularized extracellular Matrix (<i>matrice extracellulaire dépourvue de cellules</i>)
EGF	Epidermal growth factor (<i>facteur de croissance épidermique</i>)
FGF	Fibroblast growth factor (<i>facteur de croissance des fibroblastes</i>)
GAGs	GlycosAminoGlycanes
GMP	Good Manufacturing Processes
HA	Hyaluronic Acid (<i>acide hyaluronique</i>)
HA-HMW	Hyaluronic Acid – High Molecular Weight (<i>HA de haut poids moléculaire</i>)
HA-LMW	Hyaluronic Acid – Low Molecular Weight (<i>HA de bas poids moléculaire</i>)
HAS2	HA-Synthétase 2 (<i>enzyme synthétisant le HA n°2</i>)
HYAL	HYALuronidase
MEC	Matrice ExtraCellulaire
Pa, Pas	unité PAscal, PAscal-seconde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (<i>facteur de croissance des plaquettes</i>)
RHAMM	Receptor for Hyaluronan Mediated Mobility (<i>récepteur pour la mobilité due au hyaluronane</i>)
ROS	Reactive Oxygen Species (<i>dérivés réactifs de l'oxygène</i>)
RT	Room Temperature (<i>température ambiante</i>)
TGF	Transforming Growth Factor (<i>facteur de croissance transformant</i>)
TLR	Toll-Like Receptor (<i>récepteurs de type Toll</i>)
UTR	Unité de Thérapie Régénérative
UV	UltraViolets

Table des matières

1) Introduction	3
a) La Peau et les brûlures	3
i) La Peau	3
ii) Brûlures : profondeur et étendue (adultes/enfants)	3
iii) Prise en charge des grands brûlés au CHUV	4
iv) Traitements cellulaires au CHUV	5
v) Matrices de support cellulaires, l'hydrogel comme potentiel candidat	6
b) L'Acide Hyaluronique (HA)	8
i) Généralités	8
ii) Sources de HA	9
iii) Applications médicales du HA	9
iv) Matrices sur le marché à base de HA pour traiter les brûlures	9
v) Objectif de ce travail de master : formulation d'un gel pour les grands brûlés à base de HA et de cellules progénitrices fœtales (CPF)	10
2) Méthodes de l'analyse Bibliographique	10
a) Critères d'éligibilité	10
b) Stratégie de recherche	11
c) Méthode d'analyse	11
3) Résultats de l'étude bibliographique	11
a) HA - chimie et implication dans la réparation tissulaire	12
i) Chimie	12
ii) Le HA et la régénération cutanée	12
iii) Hyaluronidase	14
b) HA - applications topiques en cas de brûlures	15
c) HA - matrice de support cellulaire dans l'ingénierie tissulaire	17
d) HA – gels et hydrogels	18
i) Généralités	18
ii) Préparation d'un hydrogel de HA	18
iii) Aspects utiles pour une application topique	22
4) Discussion de la partie bibliographique	23
a) La formulation d'un hydrogel	24
b) Le choix du HA	24
c) L'encapsulation de cellules progénitrices fœtales	25
d) L'application topique	25
e) La dégradation de l'hydrogel	25
f) Conclusion de la partie bibliographique	26

5) Partie expérimentale	26
a) Matériel et méthodes	26
i) Culture des cellules	27
ii) Mélange des gels commerciaux de HA avec les cellules	27
iii) Analyse Live/Dead.....	28
iv) Statistiques.....	28
b) Résultats de la partie expérimentale	28
c) Discussion de la partie expérimentale.....	29
6) Conclusion	29
7) Bibliographie	30

1) Introduction

a) La Peau et les brûlures¹

i) La Peau

La peau constitue notre première ligne de défense. Parmi ses nombreuses fonctions, cet organe ayant une surface de 2 m² et ne mesurant que 0,05-1,5 mm d'épaisseur, permet non seulement de nous protéger contre les agressions extérieures mais également de maintenir l'hydratation et la régulation de la température corporelle de l'organisme.

Du point de vue structurel, la peau est composée de trois couches distinctes : l'épiderme (couche externe), le derme (couche intermédiaire) et l'hypoderme (couche interne). L'épiderme est principalement constitué de kératinocytes (90%), des cellules qui créent une barrière en maintenant une cohésion structurale. Cette première couche se renouvelle chaque 25 à 45 jours. Ensuite, les principales cellules du derme sont les fibroblastes, qui synthétisent le collagène, l'élastine et les glycoprotéines, dont l'acide hyaluronique (HA). Enfin, l'hypoderme est composé de cellules adipeuses, constituant la graisse sous-cutanée.

Du point de vue fonctionnel, l'épiderme permet surtout de nous protéger contre les bactéries et les radiations, tandis que le derme assure l'élasticité cutanée grâce à un réseau constitué de collagène et d'élastine. Finalement, l'hypoderme assure entre autres la thermorégulation.

ii) Brûlures : profondeur et étendue (adultes/enfants)

La peau possède un considérable potentiel de régénération. Or, lorsque la lésion est trop importante, comme lors d'une grave brûlure, la vie du patient peut être en péril car la peau ne peut plus assurer correctement sa fonction et n'est pas capable de se régénérer de façon adéquate. La profondeur de la brûlure ainsi que la surface corporelle brûlée constituent deux critères importants pour déterminer la gravité d'une brûlure.²

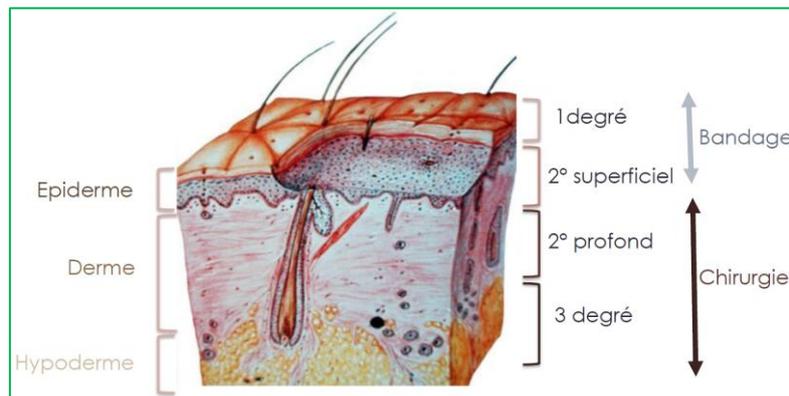


Figure 1: La peau et les degrés des brûlures (figure mise à disposition par l'UTR)

Les brûlures engendrent une nécrose de l'épiderme ainsi que des tissus sous-jacents. La profondeur de l'atteinte dépend de la température à laquelle sont exposées les cellules de la peau et de la durée de l'exposition. (1) La profondeur de la destruction cutanée causée par la chaleur est classée selon quatre niveaux ou degrés (Figure 1).

Les brûlures de 1^{er} degré affectent uniquement l'épiderme et leur guérison se fait spontanément en 3 à 5 jours sans séquelle. Les brûlures de 2^{ème} degré touchent également le derme. Lorsqu'elles atteignent uniquement la première strate dermique, elles sont dites superficielles et se résolvent en

¹ Informations fournies par l'UTR

² <http://www.chuv.ch/fr/brulures/brul-home/patients-et-familles/comprendre-la-brulure/>, 25.05.2018

1 à 2 semaines, tandis que lorsque tout l'épiderme et tout le derme sont touchés, on parle de brûlure profonde de 2^{ème} degré. Finalement, les brûlures de 3^{ème} degré détruisent l'épiderme, le derme et l'hypoderme. La greffe de peau est nécessaire lors de brûlures de 2^{ème} degré profond étendues et de 3^{ème} degré car les cellules souches nécessaires pour la régénération cutanée sont endommagées (Table 1).

Table 1: Classification des brûlures et potentiel de réparation, Adapté de Madaghiele et al. (2014) (2)

Classification des brûlures	Profondeur	Réparation cutanée spontanée
1 ^{er} degré	Épiderme	Oui : régénération épidermique
2 ^{ème} degré superficiel	Derme superficiel	Oui : épithélialisation avec ou sans cicatrice
2 ^{ème} degré profond	Derme profond	Oui : épithélialisation (si étendue limitée) avec cicatrices
3 ^{ème} degré	Derme et tissus sous-dermiques	Non

L'étendue des brûlures est calculée en fonction du degré des brûlures et du pourcentage de l'atteinte par rapport à la surface corporelle totale. En pré hospitalier, la règle des 9 de Wallace est la technique utilisée couramment pour estimer le pourcentage atteint par les brûlures. Elle permet de procéder rapidement à une première estimation en associant des multiples de 9 et de % de surface corporelle à chaque partie du corps (Figure 2) en tenant compte du fait que la main du patient représente 1% de la surface corporelle (Figure 2). Lorsque la surface corporelle brûlée atteint les 20% chez un adulte et les 10% chez un enfant, on parle d'un grand brûlé.¹

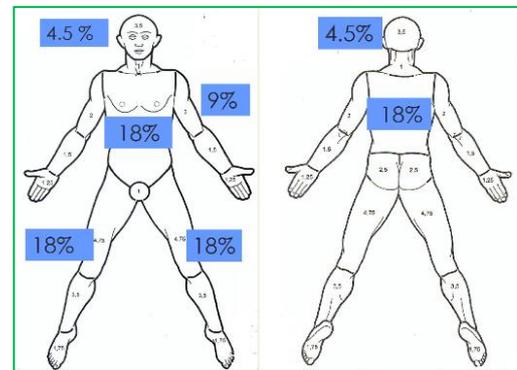


Figure 2: Règle des 9 de Wallace (figure mise à disposition par l'UTR)

iii) Prise en charge des grands brûlés au CHUV

La Suisse possède deux centres de grands brûlés : un à Lausanne (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, CHUV) et un autre à Zürich (Hôpital universitaire). Le vécu des patients peut être long et douloureux. Environ 50 à 60 grands brûlés³ par an sont admis au CHUV dans une unité spécialisée où ils sont suivis par un grand nombre de professionnels (chirurgien(e)s, anesthésistes, infirmier(e)s, physiothérapeutes, médecins nutritionnistes, biologistes, etc.).³ La prise en charge est subdivisée en 4 phases (Figure 3).

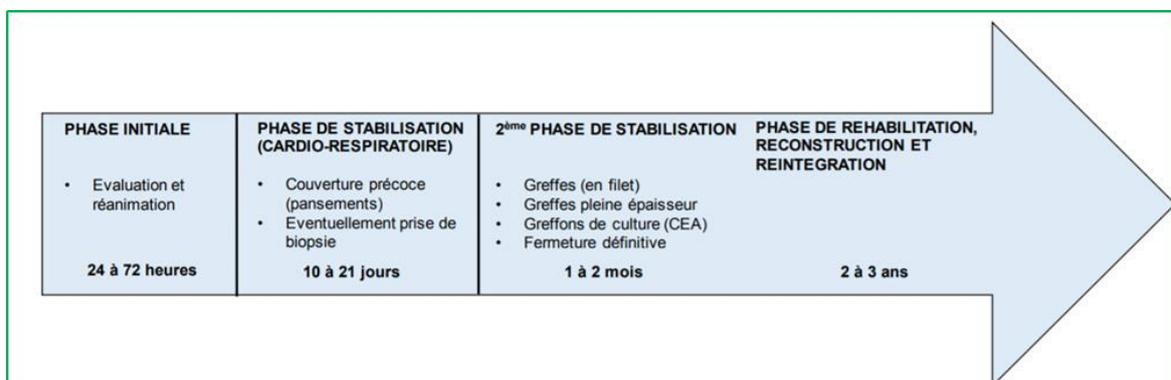


Figure 3 - Prise en charge du patient brûlé au CHUV. Adapté de Berger et al. (2004)

³ Informations fournies par l'UTR

Lors de la première phase, le patient est réanimé et l'étendue des brûlures est évaluée. Lors de la deuxième phase, dite de stabilisation cardio-respiratoire, la surface atteinte est débridée puis un antiseptique topique est appliqué. Le plus utilisé au CHUV est le Ialugen Plus®, à base de hyaluronate de sodium et de sulfadiazine d'argent. Cet antiseptique, sous forme de crème, est facilement applicable et possède une action anti-inflammatoire tout en accélérant la formation du tissu de granulation afin de favoriser la cicatrisation.⁴ D'autres produits sont également utilisés, tels que l'Aquacel argent®, une compresse d'hydrofibre, employée surtout sur le visage des grands brûlés. Rapidement, une couverture précoce (un pansement biologique) est également appliquée quotidiennement jusqu'à la chirurgie afin stimuler la réparation tissulaire. Puis, lors de la troisième phase, également de stabilisation, les plaies sont définitivement fermées grâce à des greffes. Enfin, la quatrième phase comprend la réhabilitation et la réintégration du patient.

iv) Traitements cellulaires au CHUV

(1) Techniques de greffes autologues

Lorsque les brûlures sont profondes et ne peuvent pas cicatriser spontanément, il est nécessaire d'effectuer des greffes de peau.

La méthode la plus utilisée est l'autogreffe de peau mince. Une mince couche de peau est prélevée sur la région du thorax, du dos, de l'abdomen, des membres ou du cuir chevelu lorsque la surface corporelle saine est très restreinte. Cette technique chirurgicale se nomme « greffe de peau fine », qui peut être en filet (« *meshed graft* ») ou pas, selon si la zone à recouvrir est vaste. Elle consiste à prélever, à l'aide d'un dermatome, de la peau saine d'une épaisseur de 2 mm, en décollant l'épiderme ainsi que la couche superficielle du derme et attendre que la peau se régénère (environ une semaine) afin de pouvoir recommencer le processus théoriquement jusqu'à quatre fois sur le même site et obtenir une plus grande surface cutanée pouvant être transplantée sur le même patient.

Lorsque la surface corporelle brûlée atteint les 50-60% et que la peau saine ne suffit pas à greffer les zones brûlées, la greffe en culture est pratiquée. Une des méthodes, nommée « *Cultured Epidermal Autografts* » (CEA), consiste à utiliser des kératinocytes de culture autologues destinés à jouer le rôle de greffe d'épiderme. (2) En d'autres termes, à partir d'une biopsie d'une surface de 10 cm² effectuée sur le patient, des cellules sont prélevées puis cultivées afin de créer un feuillet de cellules pouvant être réappliquées sur la peau du même patient. Cette méthode a permis de sauver la vie des grands brûlés et est utilisée au CHUV depuis 1986. La surface cutanée obtenue à partir d'un échantillon de cellules est remarquable mais il faut considérer minimum 3 semaines avant d'obtenir un greffon.⁵ À noter qu'un désavantage de la CEA est la fragilité mécanique due à l'absence de derme qui supporte la couche épidermique. Un objectif ambitieux dans le domaine de la régénération de la peau est celui de réussir à reconstituer également le derme. (2)

(2) Les pansements biologiques allogéniques

Les brûlures étendues (de 2^{ème} profond et de 3^{ème} degré) engendrent une perturbation de l'oxygénation des tissus, des pertes de liquide et de protéines qui augmentent le risque de déshydratation et d'infections. C'est pourquoi il est important de couvrir la peau du patient afin de soutenir sa réparation et limiter les conséquences. Pendant de nombreuses années, la peau de cadavre puis la peau de cochon étaient utilisés et actuellement au CHUV sont appliqués les pansements biologiques. (3)

⁴ Données mises à disposition par l'UTR

⁵ SOP du centre de production cellulaire

Les pansements biologiques sont constitués d'une matrice biodégradable, composée de collagène équin, où sont ensemencées des cellules progénitrices de peau fœtale issues d'une banque cellulaire clinique produite selon les normes GMP à partir d'un unique « don d'organe » enregistré dans le programme de transplantation.

Les cellules progénitrices fœtales sont des cellules différenciées, à ne pas confondre avec les cellules souches. Elles sont plus résistantes au stress oxydatif et ont des besoins nutritionnels minimaux tout en ayant un grand potentiel de prolifération et des propriétés immunogènes très basses.(4) Le but de ces bandages biologiques est d'activer la régénération tissulaire, donc ils ne correspondent pas à une greffe cutanée. (2)

En Suisse, le premier programme de recherche translationnelle nommé plate-forme B5, « *Biological Biodegradable & anti-Bacterial Burn-wound Bandages* » mis en place de 2014 à 2017 par l'UTR a pour but de tenter d'améliorer l'efficacité des pansements biologiques cicatrisants destinés aux grands brûlés. D'intéressantes perspectives se dessinent dans ce domaine et de nouvelles formulations de matrice pour les cellules progénitrices sont en cours de développement (Figure 4).⁶



Figure 4: Pansement biologique : cellules progénitrices sur une matrice biodégradable de collagène (figure mise à disposition par l'UTR)

v) Matrices de support cellulaires, l'hydrogel comme potentiel candidat

Différentes méthodes de livraison de fibroblastes progéniteurs ont été testées et seulement les matrices à base de collagène ont démontré de bons résultats cliniques. L'UTR est donc à la recherche de nouveaux supports afin d'augmenter l'efficacité des pansements biologiques.

(1) Définition d'un « gel »

De façon générale, le terme « gel » désigne une solution qui, à la suite d'une transformation physique ou chimique, atteint un état semi-solide tout en conservant le solvant à l'intérieur. Les gels sont des matériaux doux et humides, capables de subir d'importantes déformations. En particulier, l'organisme vivant est constitué en grande partie de gels, présents surtout dans la peau.

Les hydrogels sont des gels « gonflés » par un liquide qui est l'eau. Le corps humain possède ce qu'on appelle des « systèmes souples », constitués de collagène et de glycosaminoglycane (tel que l'acide Hyaluronique (HA)) qui sont définis des hydrogels car ils possèdent 60-80% d'eau. (5)

⁶ Données mises à disposition par l'UTR

(2) Les hydrogels

Les hydrogels, étant formés par des réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles, sont capables de retenir une considérable quantité d'eau ou de liquide biologique. Ils possèdent donc une similitude avec la MEC native tissulaire, qui leur confère plusieurs avantages. Leur biocompatibilité, leur biodégradabilité ainsi que leur capacité de supporter l'encapsulation des cellules ou des facteurs de croissance, rendent leur utilisation très vaste dans différents domaines pharmaceutiques. (6)

L'hydrogel, étant un matériau non adhérent, est capable de générer un environnement humide, « in vivo-like », permettant de réhydrater les tissus et absorber l'exsudat à partir de la lésion cutanée de manière réversible selon les stimuli environnementaux (température, pH, degré de réticulation), tout en emprisonnant les bactéries, les débris et d'autres corps étrangers grâce à l'étroite dimension de ses mailles (environ 100 nm lorsqu'il est gonflé). (2,7,8) Grâce à leur composition, les hydrogels sont capables de garder leur structure tout en absorbant davantage de liquide. De plus, la grande quantité d'eau qu'ils contiennent facilite la transmission de vapeur d'eau et d'oxygène, bénéfiques pour la réparation tissulaire. (2,8)

Donc les hydrogels sont très souvent employés pour le traitement des plaies (9) et la Figure 5 illustre bien l'intérêt porté envers cette forme de matériau. Leur utilisation en tant que matrice de support cellulaire permet de créer une barrière physique protégeant les cellules, tout en améliorant l'efficacité thérapeutique des cellules transplantées. L'encapsulation des cellules dans un biomatériau réduit en outre leur potentielle action immunogène en augmentant leur viabilité. Différents matériaux naturels et synthétiques ont été étudiés avec l'encapsulation de différents types de cellules telles que les fibroblastes ou les cellules d'îlots pancréatiques. (10)

(3) L'intérêt des hydrogels en clinique

La culture des cellules *ex vivo* est de plus en plus nécessaire pour les études dans le domaine de la médecine régénérative. La matrice de support pour les cellules ne sont pas des véhicules passifs de transport mais constituent des microenvironnements essentiels pour la signalisation et la prolifération cellulaires. Les cultures en 2D, c'est-à-dire à la surface de tissus, sont typiques *in vitro*. Toutefois, la culture des cellules dans des environnements 3D a montré être meilleure car les cellules acquièrent leurs comportements natifs. Différentes matrices 3D, destinées à la culture cellulaire et possédant les aspects du microenvironnement naturel, ont été étudiées.

Parmi celles-ci, les hydrogels synthétiques ou naturels, ont démontré une efficacité distincte grâce aux nombreuses caractéristiques citées ci-dessus. De plus, plusieurs hydrogels peuvent être créés sous des conditions cytocompatibles et être modifiés afin d'acquérir ou varier certaines caractéristiques selon le besoin. Les hydrogels peuvent être formés à partir de plusieurs matériaux naturels ou synthétiques. Les gels naturels sont formés par des protéines et des composants de la MEC tels que le collagène, le HA ou des matériaux dérivés de sources biologiques tels que le chitosan ou l'alginate par exemple (Annexe a). Leur origine naturelle leur confère une biocompatibilité et une activité biologique promouvant les fonctions cellulaires, caractéristiques bénéfiques pour la viabilité, la prolifération et le développement des cellules. (11)

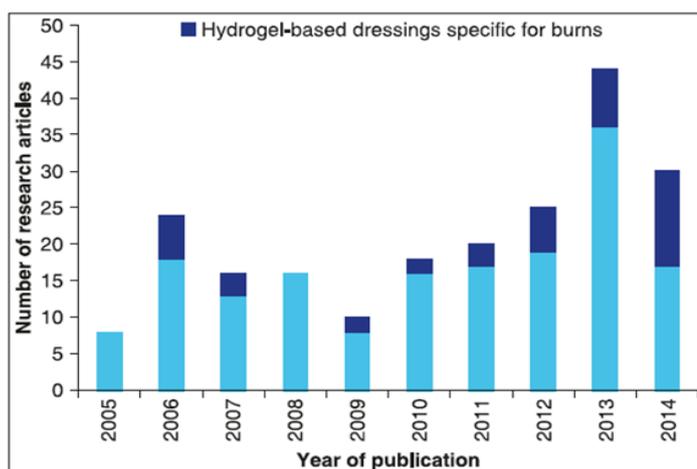


Figure 5 - Développement de matrices sous forme d'hydrogel, en particulier lors de brûlures. Nombre d'articles croissant dans les 10 dernières années, Figure 3 de Madaghiele et al. (2014) (2)

Dans l'ingénierie tissulaire, les matrices sous forme d'hydrogels sont donc très attrayantes. Parmi les différents polymères possibles, l'acide hyaluronique (HA) constitue une option très intéressante, grâce à ses nombreuses caractéristiques qui lui permettent de moduler plusieurs processus biologiques, comme la migration et la prolifération des kératinocytes. (3)

b) L'Acide Hyaluronique (HA)

i) Généralités

Le HA est un biopolymère présent naturellement dans la matrice extracellulaire des tissus de tous les animaux, majoritairement au niveau du cordon ombilical, du liquide synovial, de la peau et du corps vitré. (12) Il fait partie de la famille des GAGs et ses chaînes peuvent atteindre des longueurs de 2000 à 5000 dimères, ayant *in vivo* un poids moléculaire de 10^2 à 10^4 kDa. (6) Il est composé de séquences répétées de disaccharides d'un acide D-glucuronique et d'un N-acétyl-D-glucosamine

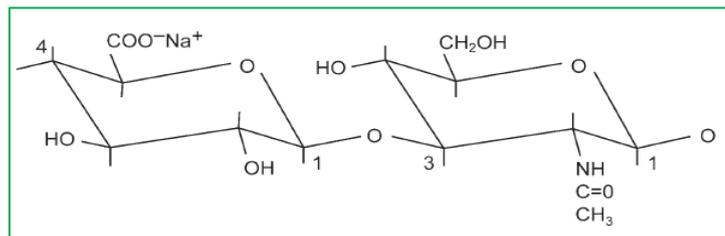


Figure 6: Unité monomérique du HA, extraite de Tezel et Fredrickson (2008), (16)

liés par des liaisons glycosidiques alternées β -1,4 et β -1,3. (13) Selon les propriétés de la molécule, différents noms lui sont attribués. Le terme « acide hyaluronique » a été attribué dès sa découverte car il se comportait comme un acide faible. Physiologiquement, il se présente sous forme d'un polyélectrolyte associé à des cations, prenant souvent le nom de « hyaluronate de sodium » ou « hyaluronate ». Le terme « hyaluronane » est utilisé pour désigner l'ensemble des formes possibles de la molécule. (14)

Le HA est sécrété principalement par les fibroblastes, cellules qui synthétisent également la hyaluronidase, une enzyme qui dégrade le HA. Le turn-over du HA est rapide, car il est renouvelé chaque jour au niveau de l'épiderme et chaque 3 jours environ au niveau du derme. *In vivo*, le HA est également détérioré par les radicaux libres. (3)

Ses propriétés uniques le rendent important pour notre organisme, car il détermine la forme et l'organisation architecturale des tissus grâce au réseau qu'il forme avec les faisceaux de collagène. Chez l'homme, 50% du HA se trouve dans la peau, où il représente un composant clé de la MEC car il maintient, entre autres, l'intégrité et l'hydratation du tissu cutané en immobilisant les molécules d'eau. (15) La concentration de HA au niveau de la peau adulte est de 0,03 à 0,09 g/100g de tissu. (6) Grâce à son pouvoir hygroscopique, il est capable de former des gels viscoélastiques en attirant et en fixant jusqu'à 1000 fois son poids en molécules d'eau. La viscosité du gel formé sera notamment dépendante de la concentration de HA, de la longueur de ses chaînes, de la température et du pH. (6)

Le rôle du HA dans la peau n'est pas seulement hydratant, car sa présence influence également la prolifération et la réparation cellulaire. (16) C'est pourquoi, lors du vieillissement, sa concentration diminue dans certaines zones et la cicatrisation se fait moins bien (15). Les propriétés du HA encouragent son utilisation dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Toutefois, le HA est vite dégradé en cas d'inflammation, ce qui limite sa présence dans les tissus et par conséquent son utilisation directe en médecine. Grâce à des méthodes chimiques destinées à modifier ses caractéristiques naturelles, la résistance du HA a pu être augmentée. (3)

ii) Sources de HA

Historiquement, le HA a premièrement été extrait à partir de crêtes de coq et de cordons ombilicaux (Table 2). Par la suite, le rendement a pu grandement être amélioré grâce à la production du HA par des bactéries. (15) Les unités monomériques du HA sont identiques selon qu'il provienne des animaux ou des bactéries. Cette ubiquité lui confère une excellente tolérance immunitaire. (17) Chez les animaux, le HA est présent dans de nombreux tissus comme les tissus conjonctifs, nerveux ou épithéliaux. Selon sa localisation, sa concentration et sa forme peuvent changer : il peut se trouver dans la matrice extracellulaire, circuler librement ou être associé à un tissu (6).

Table 2: Nature et caractéristiques des sources de HA

	Source	Rendement	Tolérance
Animaux	Crêtes de coq	0,9 g/kg de substrat + 0,5% de protéines	Désavantage : Allogénique
	Cordons ombilicaux humains	Polymère plus long : 4-6 MDa	
Bactéries	Streptococcus zooepidermicus	6-10 g/kg de moût de culture	Avantage : Excellente tolérance immunitaire
	Streptococcus equi	Polymère plus court : 1,5-2,5 MDa	

iii) Applications médicales du HA

Le HA a été découvert en 1934 mais sa première application clinique remonte à l'année 1968, où il a été utilisé pour traiter un grand brûlé. Depuis, tous les champs de la médecine ont pu bénéficier de ses nombreux bienfaits et son application s'est révélée efficace dans différents domaines tels que la chirurgie ophtalmique et esthétique, les pathologies pulmonaires et rhumatologiques, les produits cosmétiques ainsi que la régénération de la peau. (6) En effet, il existe actuellement différents produits à base de HA ayant démontré une efficacité sur la régénération tissulaire (voir chapitre: HA - applications topiques en cas de brûlures)

iv) Matrices sur le marché à base de HA pour traiter les brûlures

Selon le but recherché, différents produits à base de HA (seul ou avec cellules) ont été conçus pour le traitement des brûlures. Le HYAFF® 11 est un biopolymère dérivé du HA, qui est obtenu par des modifications chimiques d'estérification. Il permet d'augmenter la stabilité du HA tout en maintenant ses caractéristiques biologiques originales. La dégradation de produit se fait progressivement, devenant graduellement plus similaire à du HA natif. Les produits conçus avec HYAFF®11 par la Fidia Advanced Biopolymers (Abano Terme, Italie) sont illustrés dans la Table 3. Plusieurs études ont montré l'utilité et la grande efficacité de ces matrices à base de HA sur les grands brûlés. (3,18-21)

Table 3: Produits sur le marché à base de HA pour traiter les brûlures

	Nom	Composition	Indications lors de brûlures	Réf.
HA seul	Hyalomatrix 	2 feuillets - <i>Couche superficielle en silicone</i> : protection contre les contaminations, prévention perte excessive de liquides. - <i>Couche en contact avec la plaie</i> : stimule les fibroblastes grâce au relâchement prolongé et graduel de HA	Brûlures modérées à sévères	(3)
	Hyalosafe	Pansement transparent	Plaies superficielles Brûlures de 1 ^{er} et 2 ^{ème} degré superficiel	
HA + cellules	Hyalograft 3D 	1 seule membrane recouverte de fibroblastes	Plaies profondes	(17), (22)
	Laserskin 	Membrane de HA micro perforée à travers migrent les kératinocytes pour atteindre la plaie		

v) Objectif de ce travail de master : formulation d'un gel pour les grands brûlés à base de HA et de cellules progénitrices fœtales (CPF)

L'objectif de ce travail est donc celui d'explorer la littérature actuellement disponible afin d'évaluer la faisabilité, les avantages et les éventuels inconvénients d'un pansement biologique pour les grands brûlés sous forme d'un hydrogel à base de HA et de CPF.

À la fin de l'exposé bibliographique, une brève partie expérimentale est dédiée à l'étude de la survie des CPF de la peau dans des gels de HA à différentes concentrations.

2) Méthodes de l'analyse Bibliographique

a) Critères d'éligibilité

Les critères PICOS sont les suivants :

Population étudiée : modèles humains et animaux (*in vivo* et *in vitro*)

Intervention : traitement topique de HA avec +/- des cellules pour les patients grands brûlés

Comparaison : thérapies cellulaires actuelles du CHUV

Outcome : formulation optimale d'un gel avec du HA et des cellules

Schéma de l'étude : tous les types d'articles

Les références en anglais, français et italien ont été considérées. Les articles plus anciens que 1990 ont été exclus à priori afin de filtrer les informations aux 30 dernières années.

b) Stratégie de recherche

Les articles ont été recherchés sur les plateformes de Pubmed, Cochrane Library et Google Scholar. La dernière recherche a été effectuée en novembre 2017.

La recherche a été effectuée en anglais et les mots clés utilisés sont les suivants : “ hyaluronic acid or HA or hyaluronan “, “wound healing or tissue repair”, “ tissue engineering”, “cell therapy“, “burns”, “gel or hydrogel”, “topic application”, “scaffold or matrix”.

Les références utiles ont été sélectionnés par la lecture du titre et de l'abstract. De plus, une recherche manuelle des bibliographies de chaque article a été effectuée afin de trouver d'autres références utiles remplissant les critères d'éligibilité.

c) Méthode d'analyse

Une évaluation scientifique a été effectuée par les tutrices et des articles pertinents, issus des bibliographies, ont été ajoutés dans un deuxième temps.

3) Résultats de l'étude bibliographique

Soixante-huit articles ont été choisis pour l'analyse bibliographique (Figure 7) qui pour la plupart ont été publiés ces 10 dernières années (Figure 8). Ces articles ont été classés en 4 catégories principales (Figure 9) :

- 1) articles exposant les propriétés et l'utilité du HA dans la réparation tissulaire,
- 2) articles discutant de l'application topique du HA, sans l'association avec des cellules,
- 3) tous les articles où le HA figure en tant que matrice de support cellulaire dans le domaine du génie tissulaire,
- 4) articles accentuant les propriétés du gel à base de HA et ceux utiles pour la formulation d'une matrice de HA sous forme de gel incluant des cellules.

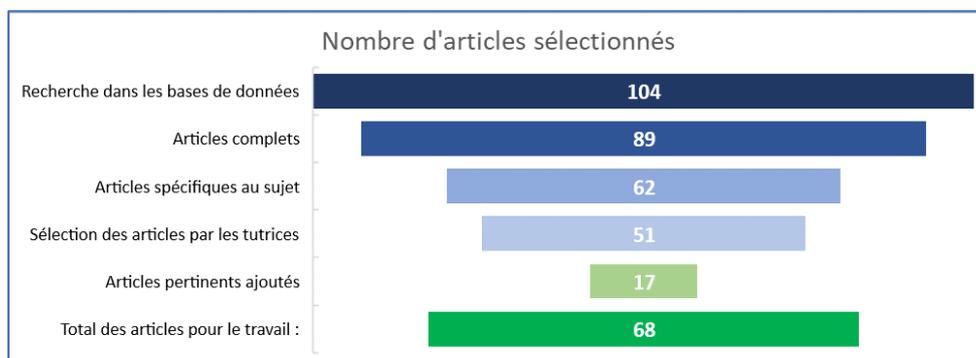


Figure 7: Résultats du nombre d'articles sélectionnés pour le travail

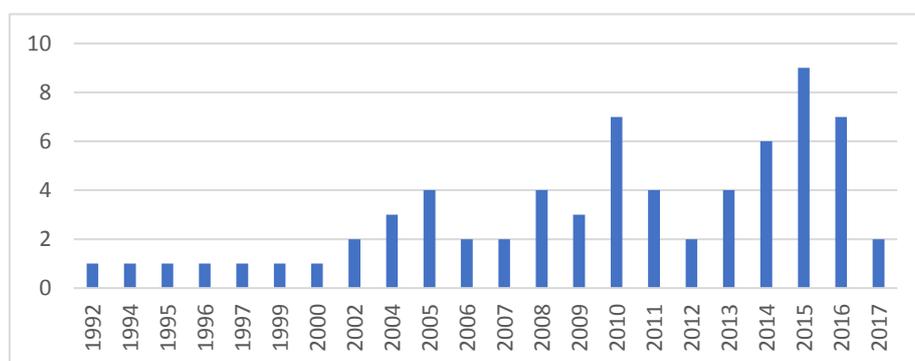


Figure 8: Répartition des articles utilisés selon l'année de parution

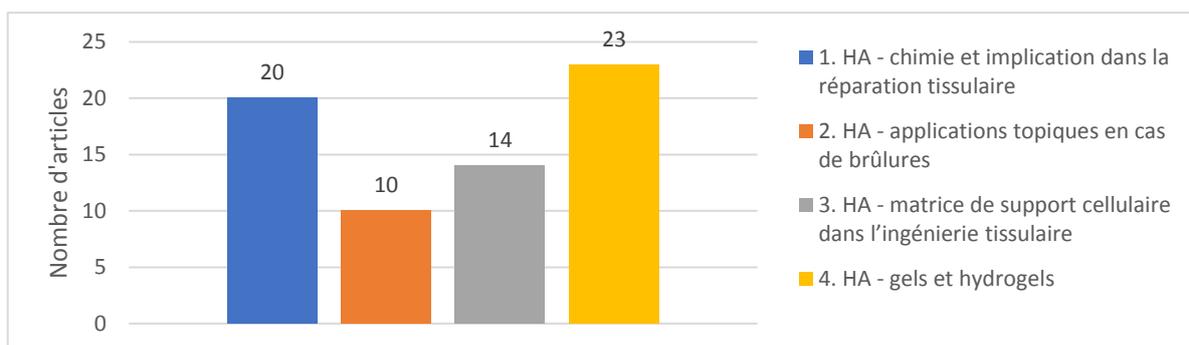


Figure 9: Classification des 68 articles en 4 catégories principales

a) HA - chimie et implication dans la réparation tissulaire

i) Chimie

Du point de vue de la **synthèse**, le HA est produit principalement à la surface des fibroblastes dermiques et des kératinocytes épidermiques par extrusion hors de la membrane plasmique en association avec le récepteur CD44, principal récepteur du HA. (23) La synthèse du HA est entre autres stimulée par différents facteurs de croissance tels que FGF, TGF- α/β , EGF, PDGF. (6) (24) Lorsque les fibroblastes ou les cellules mésothéliales sont mises en culture, elles produisent une sorte de gel autour d'elles, riche en HA, qui crée un microenvironnement pourvoyant à leurs besoins tout en les protégeant contre les agressions externes. La nature de ce gel et son interaction avec les cellules varie en fonction de la cellule en question. (12) A noter que la synthèse du HA est influencée par différents facteurs. Une étude a montré que les protéines synthétases de HA augmentent la production du HA notamment lorsque les concentrations de lactate sont élevées. (25) En effet, les lactates augmentent l'expression du récepteur CD44 et donc la concentration de HA. (24)

Les **interactions** entre le HA et les cellules se font via des récepteurs, qui sont principalement le CD44 et le RHAMM. L'interaction entre le récepteur CD44 et le HA est importante pour de nombreuses fonctions telles que l'inflammation et la réparation tissulaire. (13) Le récepteur CD44 est un puissant régulateur de la perméabilité épidermique car l'interaction entre le HA et ce récepteur régule la différenciation de l'épiderme en induisant une réorganisation du cytosquelette des kératinocytes. De plus, cette même interaction intervient également dans la formation et la sécrétion des corps lamellaires importants pour la matrice lipidique extracellulaire de l'épiderme. (26) (Annexe d)

ii) Le HA et la régénération cutanée

À l'état **physiologique**, le HA se présente dans le derme sous forme d'un polymère à haut poids moléculaire (10^6 Da). Sous cette forme, le HA n'induit pas l'expression de gènes de l'inflammation ou de la prolifération cellulaires mais est plutôt anti-angiogénique et anti-inflammatoire. Le HA-HMW a un effet cytoprotecteur et est exprimé dans les tissus sains. (6,24) Il influence considérablement la biodisponibilité des cytokines et des facteurs de croissance au sein des tissus (13). À noter que le HA-HMW promeut également l'induction des cellules T régulatrices (14). Son administration exogène a montré promouvoir la résolution des phases de la réparation tissulaire et induire donc la résolution de l'état inflammatoire. (27) De plus, dans certaines conditions, il se lie au récepteur CD44 et met les cellules en quiescence en bloquant leur signalisation qui conduit à la mitose (13). En revanche, lorsque le HA natif est lysé, il en résulte des fragments de HA-LMW (défini avec un poids <500 kDa (28)) qui se lient aux TLR, induisant l'expression de gènes inflammatoires. En effet, Gariboldi et al. (2008) ont constaté que le HA-LMW (< 200 kDa) augmente le relargage des β - défensines par les kératinocytes stimulant les récepteurs TLR 2 et 4. Il en résulte la stimulation de la production de cytokines et chémokines par les macrophages et l'activation des cellules

dendritiques et des cellules T. (29) Les fragments de HA plus petits que 12 unités induisent un « état activé » des macrophages. (27) C'est pourquoi, les fragments de HA présentent des propriétés inflammatoires et angiogéniques (entre 8-32 unités (14)) et leur présence (entre 20-200 kDa (14)) reflète l'état de stress d'un tissu. (24)

Lors d'une **lésion cutanée**, le HA joue un rôle important dans l'initiation de la réponse tissulaire, le maintien de l'intégrité cellulaire ainsi que la finalisation de la réparation de la peau. Chez l'adulte, sa quantité au niveau du site de la lésion augmente rapidement, atteignant son maximum après 3 jours. (24) Sa production est initialement assurée par les kératinocytes puis par les fibroblastes. (23) Le HA est ensuite complètement éliminé après 10 jours environ. (24) En effet, les hyaluronidases s'activent et fragmentent le HA-HMW. Les fragments résultants, surtout entre 4 et 25 disaccharides, s'accumulent et stimulent l'angiogenèse ainsi que la migration cellulaire. (6) Les oligosaccharides de HA (entre 3-10 disaccharides) ont montré dans une étude qu'ils induisent une cascade enzymatique, stimulant la prolifération des cellules endothéliales, tandis que le HA-HMW a peu d'effet. (30) Les effets des oligomères de HA ont été démontrés *in vitro* et *in vivo*, par exemple chez le rat. Le HA-LMW interagit avec les cellules endothéliales grâce à la coopération des deux récepteurs cités ci-dessus, soit le CD44 et le RHAMM. D'une part, en se liant au récepteur CD44, les oligomères provoquent une réponse mitotique ainsi qu'une induction de la croissance de nouveaux capillaires, grâce entre autres à la stimulation de la production de TGF- β localement. D'autre part, en se liant au récepteur RHAMM, les fragments de HA induisent un remodelage du cytosquelette, favorisant la migration cellulaire en fournissant aux cellules une matrice hydratée et fluide. (13,14) Le HA, surtout avec un poids moléculaire de 330 kDa, accélère significativement la migration cellulaire et la fermeture de la plaie. De plus, une étude a montré que les kératinocytes endommagés par la chaleur sont réparés de façon remarquable par le HA, en particulier avec un poids moléculaire de 1070 kDa, comparé à d'autres polymères tels que le carbomer ou l'alginate de sodium. (7)

Aya et Stern (2014), dans leur revue « *Hyaluronan in wound healing : rediscovering a major player* », expliquent l'implication du HA dans toutes les étapes de la cicatrisation cellulaire, montrant comme le HA est un promoteur de l'inflammation. Ce biopolymère constitue un élément essentiel dans le recrutement des leucocytes, dans le maintien de l'intégrité vasculaire et de l'ensemble du processus de réparation tissulaire. Les auteurs définissent le HA comme la molécule clé du milieu inflammatoire et de la régulation immunitaire de l'inflammation car il assure le dialogue entre la MEC lésée et les cellules inflammatoires (24). A noter que Safrankova et al. (2010) ont étudié le comportement des phagocytes en présence de différents poids moléculaires de HA. L'étude a révélé que les phagocytes sont potentialisés au maximum par du HA-LMW (52 kDa) et au minimum par du HA-HMW (970 kDa). (31)

Finalement, l'implication du HA dans la réparation tissulaire peut être également constatée indirectement par les différentes capacités de cicatrisation constatées chez le fœtus versus la personne âgée. Dans le premier cas, le HA est présent en grandes quantités chez le fœtus et dans le liquide amniotique, prévenant ainsi la fibrose et la formation de cicatrices. (24) Il s'avère que le HA reste plus longtemps sur le site de la lésion par rapport à l'adulte suggérant que le HA puisse en partie réduire le dépôt de collagène et éviter les cicatrices. (32) Un environnement persistant riche en HA influence les interactions entre les cellules et entre ces dernières et la MEC, impliquant ainsi à une réparation tissulaire sans cicatrice qui se constate chez le fœtus. (14) En revanche, chez les personnes âgées, le métabolisme du HA est compromis. En effet, l'habilité à générer des fragments de HA est diminuée chez les personnes âgées, ce qui entrave le processus de réparation tissulaire. (24) A savoir que le remodelage de la MEC après application du HA est augmenté avec un dépôt de collagène plus ordonné car l'adhésion cellulaire dans la MEC est liée au récepteur CD44 et au HA. La production de HA par les fibroblastes est stimulée par les facteurs de croissance tels que TGF β , β -FGF, PDGF, EGF. Toutefois, il a été démontré que les fibroblastes adultes et fœtaux ne réagissent pas de la même manière. En effet, la sensibilité des cellules fœtales aux facteurs de croissance est moindre par rapport aux fibroblastes adultes. (25)

Toutefois, l'action métabolique et l'implication du HA lors de la réparation tissulaire révélées par de nombreuses études cliniques *in vivo* et *in vitro*, semblent être mises en discussion par l'étude de Dong et al. (2016). Les auteurs mettent en évidence le fait que les effets pro-inflammatoires des fragments de HA puissent être corrélés à l'impureté du HA utilisé, car lors de l'emploi du HA sans endotoxine, il n'y a plus d'effet inflammatoire. (33)

iii) Hyaluronidase

Du point de vue de la dégradation du HA, les principales enzymes sont les hyaluronidases, D'une part, HYAL-1 est une enzyme lysosomale, présente dans tous les tissus, dont le rôle est de fragmenter le HA-HMW et LMW en oligomères. Son activité est restreinte dans un intervalle de pH entre 3.5 et 3.8. D'autre part, HYAL-2 est responsable de dégrader le HA-HMW dans la MEC et de générer des fragments d'environ 20 kDa. Son activité est optimale dans un intervalle de pH plus large, soit entre 6 et 7. (14) Il existe également une HYAL-3 dont le rôle biologique n'est pas encore bien défini et une HYAL-4 qui dégrade préférentiellement d'autres GAG, tels que les chondroïtines sulfates. La dégradation du HA est également effectuée par les ROS, et curieusement, les fragments qui en résultent protègent les cellules contre les dommages des radicaux libres. (6,23,24) Il faut noter qu'une étude de Presti et Scott (1994) a révélé que cette protection cellulaire était mieux assurée par le HA-HMW (1218 kDa) que par celui de LMW (176 et 668 kDa). (34)

Le 20-30% du turnover du HA dans la peau se fait localement tandis que le reste est éliminé par le système lymphatique. Lorsqu'il atteint la circulation sanguine, 85-90% du HA est éliminé par le foie, puis le reste par le rein. Sa demi-vie sanguine est de 2-5 minutes, donc les concentrations sanguines de HA sont physiologiquement très faibles. (12) Toutefois, lors d'une situation de stress extrême tel que les brûlures étendues, les niveaux de HA dans le sang augmentent, permettant ainsi d'expandre temporairement le volume intravasculaire en situation d'urgence. Le mécanisme se mettant en place rapidement, les concentrations de HA s'élèvent grâce à une diminution de sa dégradation plutôt qu'une augmentation de sa production, raison pour laquelle les inhibiteurs des hyaluronidases sont des protéines produites par le foie dans la phase aiguë. (24)

Il semble que la fragmentation du HA soit un processus nécessaire au déclenchement de la réponse inflammatoire et que la résorption secondaire des fragments de HA soit fondamentale pour que le processus cicatriciel puisse se terminer. (35) L'étude sur l'activité de la HYAL-1 de Fronza et al. (2014) a démontré que cette enzyme accélère le processus de réparation tissulaire. En effet, à basse concentrations, la HYAL-1 optimise la migration et la prolifération des fibroblastes, induisant une ré-épithélialisation *in vivo* plus rapide. Ils ont également constaté que cette enzyme augmente l'activité de la myéloperoxydase des neutrophiles, permettant un meilleur recrutement d'autres leucocytes, nécessaire dans le processus de réparation cellulaire. Le traitement des plaies avec la HYAL a révélé augmenter l'angiogénèse. Ainsi, les effets pro-angiogéniques démontrés par le HA-LMW, pourraient être attribués à l'activité d'une taille spécifique de la HYAL, qui reste encore à prouver expérimentalement. (36)

Nous pouvons donc constater que de nombreuses études ont démontré l'implication fondamentale du HA dans le processus de la réparation tissulaire. Ce biopolymère, composant majeur de la MEC, possède de nombreuses caractéristiques uniques qui le rendent une molécule attrayante à utiliser dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (Table 4). Le HA représente une molécule pivot du processus d'inflammation et de cicatrisation tissulaire et sa structure 3D lui permet d'être impliqué dans l'adhésion et la migration cellulaire. Son action est modulable selon son poids moléculaire, ses récepteurs et sa concentration tissulaire. Le HA-HMW possède un rôle structurel au sein de la MEC des tissus en régulant l'hydratation et la plasticité de ceux-ci. Il protège en effet les cellules des agressions enzymatiques, des UV et de la propagation virale et bactérienne.

Table 4: Résumé des propriétés du HA et leurs avantages pour l'ingénierie tissulaire

Propriété	Avantage	Commentaire	Réf.
Composant naturel de la MEC	Biodégradabilité complète	50% se trouve dans la couche dermique de la peau	(15)
Non immunogène	Biocompatibilité complète	Même structure à travers toutes les espèces	(24)
Viscoélasticité « inconstante »	Lubrification biologique idéale	Variation de la viscosité en fonction des mouvements oscillatoires. Les mouvements rapides réduisent la viscosité en augmentant l'élasticité, ce qui permet de restaurer la déformation et minimiser la distorsion cellulaire.	(12)
Pouvoir hygroscopique	Maintien important de l'hydratation du tissu permettant entre autres de faciliter les échanges de nutriments	1000 fois son poids en eau 10'000 fois son volume	(6) (24) (7)
Éliminateur des ROS	Antioxydant, protecteur de l'épiderme	Il piège les ROS et les radicaux libres générés par les UV	(32)

Les chaînes complètes de HA ont également un rôle de réservoir moléculaire grâce à leurs multiples sites anioniques qui leur permet de séquestrer ou de libérer des cytokines et des molécules de signalisation. Les oligomères de HA ont plutôt un rôle métabolique impliquée dans le fonctionnement cellulaire de la peau. Ils régulent le processus inflammatoire, l'angiogenèse et la réparation tissulaire, éléments essentiels lors de brûlures étendues (Table 5). (35,37) Davantage d'études sont nécessaires afin de comprendre si les effets métaboliques attribués au HA sont dus à ses fonctions intrinsèques ou indirectement à ses endotoxines. L'utilisation d'un HA purifié est nécessaire afin qu'il n'y ait pas de confusions. (33) Finalement, davantage d'études sur la hyaluronidase permettraient de mieux comprendre la complexité de l'équilibre entre le HA-HMW et LMW impliqués dans la réparation tissulaire.

Table 5: Comparaison des effets du HA de haut poids moléculaire vs le HA de bas poids moléculaire

HA de haut poids moléculaire	HA de bas poids moléculaire (<500 kDa)
<ul style="list-style-type: none"> • Exprimé dans les tissus sains • Influence la biodisponibilité des cytokines et des facteurs de croissance • Cytoprotecteur • Résout l'inflammation par l'induction des cellules T régulatrices • Met les cellules en quiescence (via le récepteur CD44) 	<ul style="list-style-type: none"> • Exprimé dans les tissus sous « stress » • Augmente le relargage des β-défensines par les kératinocytes • Stimule les récepteurs TLR • Induit la production de TGF-β local • Active les cellules dendritiques et les phagocytes • Stimule l'angiogenèse (via le récepteur CD44) • Active le remodelage du cytosquelette (via le récepteur RHAMM) en stimulant la migration cellulaire

b) HA - applications topiques en cas de brûlures

Les biomatériaux appliqués de manière topique chez les grands brûlés doivent pouvoir initier et stimuler une réparation tissulaire rapide et efficace en créant un environnement humide et stérile. Les polymères hydrophiles naturels ou semi-synthétiques semblent être des matrices cellulaires prometteuses pour l'ingénierie tissulaire grâce à leur biocompatibilité et leur potentielle biodégradabilité. (38)

Nous avons discuté précédemment que le HA est un biopolymère conservé à travers toutes les espèces qui a démontré avoir des propriétés viscoélastiques et biologiques uniques. En effet, son emploi recouvre diverses utilisations cliniques, comme l'application topique sur les plaies afin de

faciliter la régénération cutanée. (39) Les matériaux à base de HA peuvent contribuer à l'activité biologique des cellules contrairement aux polymères synthétiques. (14)

Le HA a grandement été investigué comme véhicule pour délivrer des médicaments que ce soit par voie ophtalmique, nasale, pulmonaire, parentérale ou topique. (40) En application topique, le HA semble augmenter le temps de résidence d'autres agents. En effet, lors d'état inflammatoire, les récepteurs CD44 et RHAMM sont up régulés favorisant la liaison du HA. (32) Différents biomatériaux à base de HA ont été mis au point afin de libérer d'une manière programmée les facteurs de croissance ou les cytokines induisant la prolifération des cellules. (35) L'action immunomodulatrice du HA est bénéfique, car elle augmente les capacités de régénération tissulaire lors de brûlures, de plaies épithéliales chirurgicales ou de plaies chroniques. (37)

Actuellement, différentes formulations du HA existent et des revues de littérature ainsi que des méta-analyses ont démontré que le HA a un effet positif sur la régénération tissulaire, notamment lors de brûlures, quelle que soit la forme d'application. Lesdites formulations peuvent prendre la forme d'un gel ou d'une crème à base de HA (Ialugen®), de matrices composées entièrement par du HA (Hyalomatrix®, Hyalofix®),⁷ des feuillets inertes imprégnés par du HA ou utilisés comme un substrat pour l'adhésion de cellules autologues destinées à la greffe (voir chapitre : HA - matrice de support cellulaire dans l'ingénierie tissulaire). Dans l'Annexe b) **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, sont résumées et illustrées les études employant les diverses formulations de HA chez les grands brûlés. (16)

Le HA a été utilisé **sous forme de gel**, notamment pour l'administration du Diclofénac, montrant être un produit bien toléré, sûr et efficace (40), ou encore pour l'administration de la vitronectine afin d'augmenter la ré-épithélialisation de brûlures partielles chez l'animal. Un des effets bénéfiques du HA est celui de maintenir la concentration de certaines molécules dans l'épiderme. (41) Un hydrogel à base de HA avec des cellules AFS encapsulées est en cours de développement, son but serait de stocker et relâcher les facteurs de croissance produits par les cellules. (42) Une autre étude, substituant le sodium, présent dans la forme la plus commune de HA, par du Zinc, a permis d'obtenir des effets antimicrobiens et anti-inflammatoires importants. Le gel à base de HA et de Zn a montré être un produit d'application topique valide chez des patients avec brûlures de 1^{er} et 2^{ème} degré superficiel. (39) En outre, l'efficacité d'un gel avec 0,2% de HA, appliqué topiquement sur des ulcères oraux, a été testée cliniquement et l'étude révèle qu'il s'agit d'une thérapie efficace et sûre en cas d'ulcères. (43) Dans une autre étude, il a été constaté que le HA-LMW stimule activement la production du peptide β -défensine 2 lorsqu'il est appliqué sur la peau, induisant par conséquent une réponse antibactérienne. Les auteurs ont étudié son effet en appliquant un gel avec 0,2% de HA pour traiter la dermatite séborrhéique. (44)

En outre, Mesa *et al.* (2002) ont constaté que le traitement topique avec du HA-HMW réduisait significativement l'infiltrat inflammatoire au niveau gingival chez les patients. En effet, il semble que le HA-HMW exerce son action anti-inflammatoire en réduisant l'expression de l'antigène de prolifération Ki-67 et en bloquant le récepteur CD44. (30)

L'utilisation du HA **sous forme de crème** a été étudiée en association à d'autres produits tels que la sulfadiazine d'argent, qui est l'un des produits de référence dans la thérapie des brûlures pour ses effets bactériostatiques. En effet, différentes études ont révélé que l'application topique d'une crème contenant 1% de sulfadiazine d'argent et 0,2% de HA induit une ré-épithélialisation des brûlures significativement plus rapide par rapport à l'application de la sulfadiazine d'argent seule, démontrant l'activité du HA lors de la réparation tissulaire. De plus, cette association réduit davantage l'œdème local permettant d'obtenir également un effet analgésique. (1,45)

⁷ Table 3

Comme énoncé dans l'introduction, la crème Ialugen®, à base de HA et de sulfadiazine d'argent, est un traitement de référence chez les grands brûlés au CHUV. En effet, l'application du HA sur les plaies ordonne le dépôt du collagène et améliore le remodelage de la MEC. (6)

Finalement, nous pouvons donc constater que le HA est un biopolymère largement utilisé, notamment pour la fabrication de matrices d'hydrogel, que ce soit pour l'administration de médicaments ou de facteurs de croissance. Sa biocompatibilité à travers les espèces, sa viscoélasticité et son activité immunomodulatrice, le rendent un polymère très valide et efficace dans l'application topique cutanée, spécialement lors de brûlures.

c) HA - matrice de support cellulaire dans l'ingénierie tissulaire

L'élaboration d'un tissu artificiel nécessite de cellules, d'une matrice de support et de facteurs de croissance. Les cellules progénitrices, les cellules souches ou les cellules d'une lignée spécifique représentent une nouvelle technique dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour le relâchement thérapeutique de biomolécules. (10) La fabrication de matrices de support à partir de matériaux naturels, tels que le HA, confère à la structure des signaux intrinsèques qui peuvent optimiser la formation tissulaire. (46)

En effet, les cellules souches hématopoïétiques, embryonnaires et mésenchymateuses résident dans un microenvironnement particulier, riche en HA, qui les maintient dans une forme quiescente avec un faible taux de prolifération, notamment via l'interaction avec les récepteurs du HA tels que le CD44 et le RHAMM qui sont essentiels. Les cellules souches mésenchymateuses qui se trouvent dans les tissus adultes, expriment de façon importante le récepteur CD44 lorsqu'elles sont stimulées par le PDGF. Ceci facilite leur migration grâce à l'interaction avec le HA extracellulaire. Ce mécanisme de migration est fondamental pour le recrutement des cellules souches mésenchymateuses et donc la préparation à la régénération tissulaire. (14)

Une matrice cellulaire doit avoir une stabilité biologique, doit être compatible avec les cellules du corps et sa structure mécanique doit pouvoir protéger les cellules tout en influençant leurs comportements tels que l'adhésion, la croissance ou la différenciation. Il a été montré que l'ajout GAGs dans les gels de collagène permettait de mieux mimer l'environnement naturel des cellules, augmentant ainsi la biocompatibilité du gel. Or, le HA est un GAG naturel présent dans la matrice extracellulaire dans la peau. (47) C'est pourquoi, du point de vue de l'ingénierie tissulaire, une matrice constituée par du HA améliorerait donc la survie cellulaire et permettrait le relâchement des cellules via une dégradation enzymatique progressive du HA, contribuant ainsi à la réparation tissulaire. De plus, elle optimiserait la migration des cellules en créant un milieu hydraté et non adhésif. (14)

Les différentes matrices uniquement à base de HA, avec ou sans cellules, sont résumées dans la Table 3. La matrice Laserskin, contenant des cellules, a démontré sa nette efficacité lors de plaies chroniques ou en cas de brûlures. (20) (21)

En outre, différentes études dans la littérature ont cité les bénéfices du HA en tant que matrice de support cellulaire. Dans une étude chez l'animal, l'hydrogel de HA d'aspect spongieux, contenant des cellules dermiques et épidermiques encapsulées, a montré accélérer la réparation tissulaire, la ré-épithélialisation et la néo vascularisation chez le rat. (48) Une autre étude récente (2013) a employé une thérapie de remplacement cellulaire et a décrit les effets bénéfiques d'un hydrogel à base de HA (injectable) utilisé comme matrice de support afin de délivrer les cellules progénitrices en cas de rétinopathie. (49)

La présence de 1% HA sur des matrices xénogéniques, utilisées en association à des facteurs de croissance, a montré que le HA augmente l'adsorption du facteur de croissance et soutient le relâchement de celui-ci à partir de la matrice. (50,51)

Neuman *et al.* (2015) ont résumé dans leur revue systématique toutes les études au sujet de la régénération tissulaire où le HA était impliqué ainsi que toutes les études où le HA était employé

comme composant d'une matrice pour la réparation tissulaire (*Table 1 de l'Annexe c*)**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Les résultats montrent que dans la grande majeure partie des études, le HA a apporté un bénéfice à la réparation tissulaire.

En résumé, nous pouvons donc affirmer qu'une matrice à base de HA et de cellules favoriserait la régénération tissulaire. Une matrice de support à base de HA permet de mimer le microenvironnement hydraté et non adhésif, particulier de la MEC, facilitant ainsi la survie cellulaire. De plus, la dégradation progressive du HA laisse place au relâchement progressif de cellules ou de molécules contenues dans la matrice. L'efficacité clinique du HA en tant que matrice de support cellulaire a été significativement démontrée, raison pour laquelle de nouvelles formulations seraient une avancée dans le domaine de l'ingénierie tissulaire.

d) HA – gels et hydrogels

i) Généralités

Des préparations d'hydrogels à base de HA peuvent apporter différents avantages, grâce aux propriétés physicochimiques uniques de ce biopolymère, telles que sa viscoélasticité, son pouvoir hygroscopique, sa biocompatibilité, mais également grâce à sa capacité d'accélérer la réparation tissulaire. C'est pour ces raisons que le hyaluronane, sous forme d'hydrogel, est de plus en plus utilisé en tant que matrice, car il a montré une supériorité par rapport à d'autres polymères tels que le carbomer ou l'alginate de sodium. (7) Le HA est reconnu comme un polymère crucial dans les thérapies cellulaires, les cultures cellulaires 3D et l'ingénierie tissulaire. (52)

Burdick et Prestwich (2011) illustrent dans leur article les nombreuses techniques de modifications chimiques du HA en lien avec l'encapsulation des cellules et la fabrication d'hydrogel à base de HA pour les applications biomédicales. En effet, ils affirment que les biomatériaux basés sur des biopolymères chimiquement modifiés permettent d'exploiter les voies de dégradation biologiques, contrairement aux matériaux synthétiques. (53)

Une revue systématique de littérature s'intéressant au HA et à la réparation tissulaire, réalisée par Neuman *et al.* (2015), a constaté que différentes études ont mis en évidence les propriétés du HA selon la variation de divers paramètres. En effet, selon la concentration ou le poids moléculaire du HA, l'effet biologique changeait. Les auteurs révèlent les résultats d'une étude où des gels avec des différentes concentrations de HA ont été mis en contact avec des cellules lésées par de l'éthanol. D'une part, les solutions contenant une concentration de 2% ou 4% de HA (provenant du cordon ombilical humain) avaient un effet protecteur, grâce à la diminution de l'état inflammatoire et la prévention de l'apoptose. D'autre part, le gel contenant 8% de HA n'avait pas d'effet cytoprotecteur car la pénétration du gel dans les cellules était rendue difficile par sa haute viscosité. (48)

Toutefois, même si les résultats des études précliniques et cliniques sont impressionnants, il faut noter que peu d'hydrogels avec des cellules encapsulées sont présents sur le commerce car l'hydrogel a une capacité limitée à supporter la viabilité et la fonction des cellules sur le long terme. À ce propos, Schmidt *et al.* (2008) dans leur revue « *Hydrogels used for cell-based drug delivery* » ont présenté différentes stratégies utiles afin d'améliorer l'efficacité thérapeutiques des hydrogels contenant des cellules. Certains aspects seront discutés dans le prochain chapitre. (10)

ii) Préparation d'un hydrogel de HA

(1) Les dérivés de HA

Le HA peut être modifié chimiquement et ses propriétés chimiques et biologiques peuvent être altérées. Les dérivés de HA sont classifiés en « monolithique » ou « living ». Les dérivés « monolithique » se trouvent sous une forme terminale, ne permettant pas de créer de nouveaux liens avec les cellules ou les molécules, tandis que les dérivés de HA « living » peuvent former des liens covalents en présence de cellules, de tissus ou de molécules permettant donc leur incorporation.

(52) (53) Cette dernière forme de HA est donc généralement nécessaire pour son utilisation clinique et préclinique dans la culture cellulaire 3D ou la livraison des cellules *in vivo*. (53)

(2) Le processus de réticulation (« crosslinking »)

Le HA obtenu par le fabricant se présente sous la forme d'une poudre blanche. Lorsque cette dernière est mélangée à de l'eau, nous obtenons un liquide très visqueux, comparable au blanc d'œuf. Cette solution est appelée HA libre (non modifié) ou HA non réticulé (« *uncrosslinked* ») qui est un excellent lubrifiant. (17) Le HA soluble a été utilisé dans diverses applications cliniques telles que la viscosupplémentation pour l'arthrite, la chirurgie oculaire ou la cicatrisation des plaies. Toutefois, le HA soluble non réticulé possède de faibles propriétés mécaniques et subit une dégradation rapide *in vivo*, ce qui limite son utilisation. Cependant, les propriétés du HA soluble peuvent être améliorées en augmentant son hydrophobie par des processus de réticulation (« *crosslinking* »). (46)

Le HA peut être réticulé à un degré variable, créant un réseau de polymères et transformant le liquide visqueux en un gel. Cette transformation aboutit à un gel qui se comporte comme une unité, une barrière chimique et physique pour les enzymes et les radicaux libres qui peuvent dégrader le produit beaucoup plus lentement. (17) La dégradation enzymatique complète par la hyaluronidase est liée au degré de réticulation de l'hydrogel de HA. Plus important est le degré de réticulation, meilleure est la stabilité de l'hydrogel de HA. (46)

Le degré de réticulation va influencer également l'« équilibre d'hydratation » de l'hydrogel, une notion qui aura un impact sur la capacité d'absorption de l'eau de la part du HA. En effet, selon ses caractéristiques (concentration, degré de réticulation), le HA absorbera plus ou moins l'eau de son environnement. Par exemple, dans le contexte des produits de comblement dermique, Tezel et Fredrickson (2008) affirment que l'équilibre d'hydratation s'obtient avec 5,5 mg de HA/ml d'eau avec un degré de réticulation typique (*qui est de 4% pour les produits de comblement dermique*). Si on augmente la concentration de HA (20-24 mg/ml), cela signifie que l'on se trouve en-dessous de l'équilibre d'hydratation et donc que le produit absorbera de l'eau de son environnement. (17)

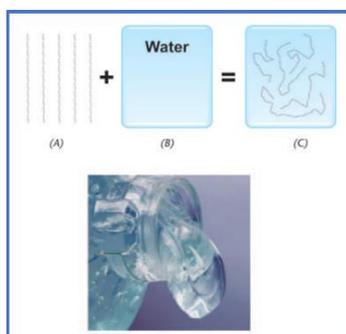


Figure 10: Le HA en contact avec l'eau - Les chaînes de HA (A) dissoutes dans l'eau (B) forment un liquide visqueux (C), Extraite de Tezel et

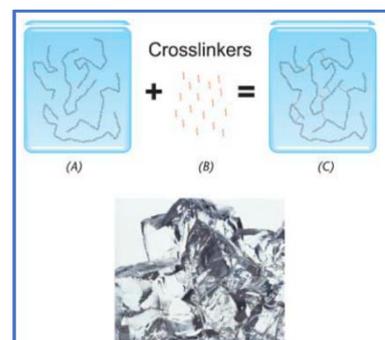


Figure 11: Formation d'un gel de HA - L'ajout d'un "crosslinker" (B) à la solution de HA (A) forme un réseau se manifestant macroscopiquement comme un gel (C) Extraite de Tezel et Fredrickson (2008).

(3) La viscosité

En effet, le HA peut changer ses caractéristiques selon son degré de réticulation en influençant notamment la viscosité dynamique du gel. Cette dernière se mesure en unité de Pas. Grognuz et al. (2016) ont comparé différents gels de HA, afin d'évaluer la formulation qui puisse avoir de bonnes propriétés rhéologiques tout en permettant la survie des cellules, leur but étant celui de créer une préparation d'un gel de HA contenant des ténocytes progéniteurs. Les auteurs ont constaté qu'à chaque unité de Pas supplémentaire, 0,3% de la survie des cellules était perdue, mais qu'une viscosité dynamique moindre que 5 Pas était insuffisante pour maintenir les cellules en suspension sur le long terme. En effet, si la viscosité augmente, la force de cisaillement qui s'applique à la surface des cellules entraîne une rupture membranaire. Ils en ont conclu que la viscosité de l'Ostenil

Tendon (gel avec 2% de HA) serait le choix le plus adapté pour l'injection dans les tendons, mais également dans l'application topique à la surface d'une plaie. (54)

Il a été démontré que les propriétés mécaniques modulent le comportement et le phénotype des cellules de façon semblables aux signaux biochimiques.

Le but de ce travail étant celui de discuter de l'application d'un hydrogel sur les brûlures, nous nous intéressons particulièrement aux fibroblastes dermiques qui constituent les principales cellules impliquées dans le processus de régénération tissulaire. Ghosh *et al.* (2013) ont étudié l'interaction entre des fibroblastes dermiques adultes et un hydrogel à base de HA (1%) et de fibronectine. Ils ontensemencé les cellules dans un puits de 35 mm de diamètre avec une densité de 500 cellules/cm² et les ont observés sur 3 jours. La viscosité de l'hydrogel était modulée par la concentration du « crosslinker » qui était entre 0,75%, 1,5% et 4,5%. Les forces de cisaillement variaient donc entre 95 Pa, 550 Pa et 4270 Pa. Il faut savoir que la migration cellulaire est un processus qui requiert une coordination spatio-temporelle cellulaire importante et que cette fonction est donc étroitement liée à la cellule et aux propriétés mécaniques du substrat dans lequel elle se trouve. L'étude révèle que les cellules sont soumises à d'importantes forces de traction lorsque le substrat est visqueux. En effet, la viscosité du substrat est proportionnelle à leur capacité d'adhésion et inversement proportionnelle à leur vitesse de migration. En d'autres termes, l'augmentation des tractions dues à la viscosité du gel ralentit la migration des cellules mais leur permet d'accroître leur force d'adhésion. De plus, les résultats montrent que l'augmentation de l'adhésion dans les gels visqueux favorise la prolifération des cellules. D'ailleurs, le taux de prolifération, suivi sur 3 jours, décline progressivement et significativement dès le 2^{ème} jour lorsque le gel est fluide (min de 95 Pa) tandis qu'il augmente significativement dans les gels plus visqueux (max de 4270 Pa). (55)

(4) La concentration de HA et de cellules dans le gel

Une étude a testé du HA de différents poids moléculaires (10, 330, 600, 1070, 1500kDa) sur des fibroblastes de souris endommagés par une exposition à 54°C pendant 5 minutes. Les cellules ont été conservées avec le gel de HA à 37°C pendant 24h. Les résultats ont révélé que le HA n'était pas toxique lorsque la concentration était de 0,01% et 0,1% et légèrement toxique lorsqu'elle atteignait le 0,5% (cytotoxicité totalement acceptable) (Figure 12). À noter que la toxicité était bien moindre qu'avec le carbomer et l'alginate de sodium, polymères très fréquemment utilisés pour constituer les hydrogels. (7) La concentration de 0,2% de HA-LMW semble être la concentration standard utilisée dans les traitements topiques à base de HA. (29)

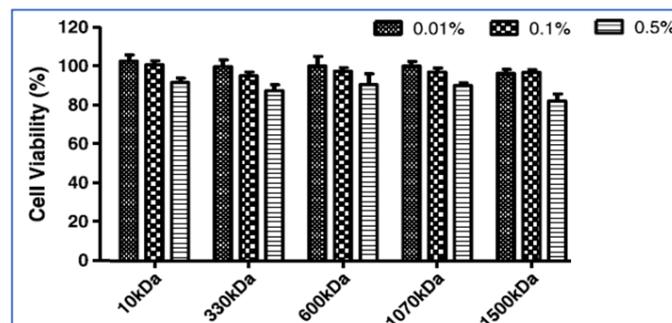


Figure 12: Cytotoxicité du HA sur les L929 fibroblastes de rat, Adapté Guo *et al.* (2015) (7)

Concernant la concentration de cellules, il a été constaté que la concentration adéquate dans un gel serait de 2,5 millions/traitement. Les auteurs disent que la quantité de 1 à 10 millions de cellules est souvent retrouvée dans des études *in vivo*. (54)

(5) L'encapsulation des cellules

Comme énoncé précédemment, le processus d'encapsulation des cellules au sein d'un hydrogel est une étape clé pour la réussite du produit. Il existe différentes techniques divisées en deux catégories: la macroencapsulation (grandes quantités de cellules dans un grand volume de produit) et la micro encapsulation (cellules introduites dans de petits volume de produit). Les techniques de micro

fabrication ont été utilisées pour encapsuler des cellules avec le HA avant que celui-ci ne soit réticulé, donc ne devienne un hydrogel. Les propriétés rhéologiques de la solution (avant la formation de l'hydrogel) sont fondamentales pour maintenir la viabilité des cellules ainsi que leur adhésion mutuelle durant le processus d'encapsulation, raison pour laquelle les cellules sont souvent mélangées à la solution avant que le polymère en question soit réticulé. En effet, lorsque les cellules sont mélangées à une solution trop visqueuse, leur viabilité décroît considérablement en raison de l'importante force de cisaillement qui endommage les membranes plasmiques et interrompt les contacts entre les cellules. (10) Dans une étude expliquant la micro encapsulation des cellules dans un gel de HA, les auteurs utilisent des concentrations de HA entre 2% et 15%. Ils expliquent qu'une haute concentration de HA permet d'obtenir une intégrité mécanique des microstructures mais qu'en revanche cela revient à être cytotoxique pour l'encapsulation des cellules. Ils proposent une concentration optimale de 5% de HA dans l'eau/PBS (5g dans 100 ml). (9)

Afin d'améliorer la viabilité des cellules souches dans un hydrogel de HA, Kim *et al.* (2010) proposent l'incorporation de microsphères de dextrane au sein de l'hydrogel. Le dextrane étant un polysaccharide biodégradable, hydrophile et biocompatible, il a souvent été utilisé comme transporteur pour la livraison de cellules dans les matrices d'ingénierie tissulaire. Dans leur étude, les auteurs ont constaté que les cellules souches embryonnaires humaines, lorsqu'elles sont encapsulées dans l'hydrogel de HA, maintiennent leur état indifférencié tout en préservant leur capacité totale de différenciation. L'utilisation des microsphères de dextrane offre une interface entre l'hydrogel et les cellules souches. Par conséquent, les effets synergiques prolongent la survie cellulaire, améliore leur activité et optimise la force de l'hydrogel en promouvant la régénération tissulaire. (56)

Il est également important que la chimie et les produits de dégradation du gel ne soient pas délétères pour les cellules encapsulées. Généralement, les propriétés chimiques et mécaniques du gel sont déterminées durant le processus d'encapsulation des cellules. (11)

Il faut noter que les dérivés de HA doivent souvent être préparés à de hautes températures avec des conditions de réticulation très alcalines qui empêchent l'inclusion de cellules vivantes durant la préparation de l'hydrogel. De façon intéressante, l'étude de Luo *et al.* (2000) présente la formulation d'un nouvel hydrogel à base de HA qui se prépare sous des conditions neutres et qui se transforme en quelques secondes en un hydrogel, pouvant être utilisé directement sans avoir besoin de purification ultérieure. (57)

Finalement, la distribution spatiale des cellules au sein de l'hydrogel peut être contrôlée par les techniques de bio-printing (2), capable de déposer les cellules avec précision et de les encapsuler dans l'hydrogel. (58)

(6) *Le contrôle du transport de protéines*

La matrice de support cellulaire doit pouvoir fournir l'environnement et les signaux appropriés pour diriger les processus cellulaires et la formation des tissus. La surface de la matrice assure l'adhésion des cellules ainsi que leur migration, ce qui peut influencer leur survie ou leur capacité d'envahir le tissu environnant. (5)

La capacité de l'hydrogel à faciliter l'influx et l'efflux de molécules biologiques fait partie des critères à considérer pour que le produit soit efficace. (10) Par exemple, lors de la synthèse d'un gel, il est possible d'induire un certain degré de porosité selon les paramètres appliqués. En particulier, il existe une « cryopolymérisation », à basse température, aboutissant à la formation de cryogels. Ces derniers sont des gels avec un réseaux 3D possédant des macropores interconnectés. (5) Selon une étude, ils présentent une meilleure stabilité mécanique par rapport aux hydrogels traditionnels. C'est pourquoi, les auteurs affirment que les cryogels représentent une potentielle matrice 3D pour l'ingénierie tissulaire. La structure avec les pores ouverts permet le transport de nutriments et d'oxygène aux cellules et à l'inverse, l'élimination des déchets cellulaires. En combinant l'excellente biocompatibilité du HA avec les propriétés avantageuses des cryogels, l'étude a montré que les

cryogels créent un matrice physiologique adéquate pour les fibroblastes et qu'ils sont efficaces en tant que substrats 3D pour les cultures à long terme des fibroblastes dermiques *in vitro*. (38) Une autre étude affirme qu'une matrice de HA avec une macroporosité aurait l'avantage de permettre l'invasion tissulaire des cellules encapsulées. (53)

(7) DCM et Collagène : quelques possibilités d'association avec le HA

Il est possible de réguler les interactions cellulaires au sein de l'hydrogel de HA de différentes façons, notamment en introduisant des sites d'adhésion cellulaires dans le HA ou en associant des protéines d'adhésion telles que le collagène, la laminine ou la fibronectine. C'est pourquoi, le HA soluble est souvent mêlé aux gels de collagène afin de profiter des bénéfices du HA tout en évitant ses limitations mécaniques. Il a été constaté que l'ajout de collagène dans le gel de HA permet une dégradation moins rapide que celle d'un hydrogel de HA seul et diminue le pourcentage d'eau retenue. (46)

En outre, une étude se penchant sur la régénération des cordes vocales a comparé l'utilisation d'un hydrogel de HA en le comparant à un cogel HA-collagène et HA-DCM (*decellularized extracellular matrix*). Les résultats ont révélé que l'hydrogel à base de HA seul possède une activité biologique limitée pour supporter la prolifération des cellules souches adipeuses encapsulées à l'intérieur. Toutefois, l'incorporation de DCM permet de fournir un environnement plus favorable pour la croissance et la différenciation des cellules par rapport aux comparatifs. Par conséquent, les auteurs affirment qu'un cogel à base de HA et DCM serait une matrice de support prometteuse en ce qui concerne les cellules souches adipeuses. (59)

(8) La dégradation de l'hydrogel

L'activité biologique de l'hydrogel *in vivo* dépend étroitement de ses caractéristiques micro structurelles (composition chimique, densité de réticulation, etc.) et macro structurelles (viscosité, taux de dégradation, etc.) pouvant influencer directement le comportement des cellules encapsulées et indirectement leur intégration dans le tissu de l'hôte. En particulier, la dégradation de l'hydrogel est fortement liée à la capacité des cellules de migrer à travers la matrice du gel, car leur infiltration sera inhibée par les étroites dimensions des mailles du polymère. (2)

La dégradation du HA contenu dans l'hydrogel sera sensible à la présence de la hyaluronidase. La concentration de l'enzyme et son temps d'exposition avec le HA, influenceront donc la dégradation de l'hydrogel. Cependant, étant donné que les fibroblastes sont des cellules produisant la hyaluronidase, il est possible de prévoir que la conservation à long terme de ces cellules au sein d'un gel de HA pourrait compromettre la conservation de l'hydrogel. Khademhosseini *et al.* (2006) ont constaté dans leur étude que les cellules encapsulées dans l'hydrogel, après avoir subi un traitement avec de la hyaluronidase, ont survécu 24h après que le gel ait été complètement dégradé. (9) Les macrophages semblent également impliqués dans la dégradation rapide de l'hydrogel à base de HA. (2)

Idéalement, la vitesse de dégradation de l'hydrogel devrait coïncider avec la vitesse de formation tissulaire. Une dégradation trop lente compromettrait le remodelage tandis qu'une dégradation trop rapide induirait une résorption précoce de la matrice de support. Une étude a conclu qu'une dégradation dans l'espace de 7 jours serait optimale afin de permettre la migration des cellules angiogéniques et induire la néo vascularisation tissulaire. (2)

iii) Aspects utiles pour une application topique

Jones et Vaughan (2005) ont publié une revue de littérature concernant l'utilisation des hydrogels dans différents types de plaies. Parmi les hydrogels étudiés, ils ont constaté que ceux ayant une viscosité aux alentours de 200-300 Pas possèdent une moindre résistance à l'écoulement et donc une meilleure facilité d'application topique, par rapport à des viscosités aux alentours de 600 Pas. (8) De même, l'élasticité des gels influence également l'état de l'hydrogel après son application. Par exemple, une élasticité trop basse aux alentours de 300-500 Nm⁻² suggère que le gel possède une faible structure et donc aurait tendance à couler après avoir été appliqué. (8)

Une autre importante caractéristique que les auteurs relèvent, concerne la capacité du gel à rester en place sur la durée après avoir été appliqué. Le maintien de sa forme et de sa consistance sont des propriétés importantes pour éviter la formation de cicatrices. (8)

Les hydrogels de HA semblent être un potentiel moyen de livraison lorsque la peau est endommagée. (60) La capacité de pénétration cutanée du HA semble être controversée. Une première étude (1999) déclare que le HA est capable de pénétrer l'épiderme, le derme et d'atteindre les voies lymphatiques tandis que la deuxième (2000) reporte que le HA ne traverse pas la couche cornée de la peau. (30) Cependant, une peau lésée possède une épaisseur épidermique diminuée et une moindre organisation des lipides. Ceci permet une meilleure pénétration du HA dans la peau endommagée. Witting *et al* (2015) suggèrent que la pénétration idéale est atteinte avec du HA de 100 kDa. (60)

À noter que l'hydrogel apporte un confort lors de son application, que ce soit pour le patient que pour le chirurgien. Il produit une sensation rafraîchissement très utile pour les patients grands brûlés ainsi qu'un effet apaisant sur les tissus qui peut significativement réduire la douleur. (8)

En résumé, les hydrogels, étant similaires à la MEC native tissulaire, permettent de maintenir l'hydratation et l'oxygénation des tissus, d'emprisonner les débris et les microorganismes ainsi que de protéger les cellules en créant une barrière physique. Leur utilisation en tant que matrice de support pour le traitement des plaies est en augmentation et diverses études ont montré leurs bénéfices. Des cellules peuvent être encapsulées au sein de l'hydrogel et la culture au sein de cet environnement 3D a montré être meilleure que sur des supports 2D. Les hydrogels naturels à base de HA possèdent une biocompatibilité et une activité biologique intrinsèque qui leur confèrent divers avantages comme la promotion des fonctions cellulaires. Une attention particulière doit être portée à différents aspects lors de la préparation d'un hydrogel de HA avec des cellules encapsulées, tels que le processus de réticulation du HA, la viscosité du gel, la concentration du HA ainsi que le procédé même d'encapsulation cellulaire. La dégradation de l'hydrogel par les hyaluronidases doit également être considérée car la migration, l'infiltration tissulaire des cellules ainsi que sa facilité d'application topique vont en dépendre. Les hydrogels à base de HA, appliqués de façon topique sur les brûlures, semblent donc être un moyen de livraison des cellules simple, efficace et agréable pour le patient et le chirurgien.

4) Discussion de la partie bibliographique

En Suisse, entre 50 et 60 grands brûlés arrivent aux centres du CHUV et de Zürich dont 23% nécessitent une greffe de peau car l'atteinte est trop étendue. La nécessité de greffe cutanée soulève plusieurs défis car sa mise en place nécessite du temps et dans l'attente de la chirurgie, une couverture précoce doit être appliquée sur les lésions. Le but de ces pansements biologiques est d'activer la régénération tissulaire. Divers produits accomplissent différentes fonctions, que ce soit la protection contre les microbes, la promotion de la réparation tissulaire ou la provision en cellules progénitrices fœtales qui peuvent être incorporées dans le site de la lésion. (22) Les thérapies utilisant les cellules souches/progénitrices constituent une avancée très prometteuse. (59) Au CHUV, les pansements biologiques à base de CPF déposées sur une membrane de collagène sont les plus utilisés, car les matrices de collagène sont celles ayant montré les meilleurs résultats. En effet, l'emploi de polymères présents dans la MEC native est meilleur du point de vue biologique. Parmi ceux-ci, le HA est un biopolymère avec des caractéristiques uniques et très prometteuses. C'est pourquoi, l'ingénierie tissulaire est actuellement à la recherche de nouveaux produits permettant d'optimiser la régénération cutanée, et les matrices sous formes d'hydrogel sont très attrayantes.

a) La formulation d'un hydrogel

Dans le domaine du traitement des plaies, les hydrogels jouent un rôle important, car ils peuvent absorber et relâcher de l'eau de façon réversible. Les hydrogels sont utilisés dans diverses applications biomédicales et leurs propriétés varient en fonction du but recherché. Ils retiennent donc l'exsudat des plaies et promeuvent la prolifération des fibroblastes ainsi que la migration des kératinocytes, importante pour une complète épithélialisation. (2)

Il y a différents types d'hydrogels naturels, utilisés pour le traitement des plaies, qui sont basés sur des matériaux biologiques présents naturellement dans la MEC, tels que le collagène, le HA, le chitosan ou l'alginate. (58)

En outre, les hydrogels peuvent être utilisés en association avec des cellules car ils leur procurent une barrière de protection. De plus, ils augmentent l'efficacité des cellules transplantées en améliorant leur sécrétion de protéines thérapeutiques. (10)

La formulation d'un gel à base de HA en tant que matrice de support de CPF semble être possible selon la littérature, et semble même être bénéfique. L'analyse bibliographique révèle la nécessité de considérer certains paramètres importants, tels que la viscosité du gel, le poids moléculaire et la concentration du HA employé.

Un hydrogel de HA, en tant que matrice cellulaire, doit être capable de promouvoir l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation des cellules (55) tout en possédant différentes caractéristiques importantes pour la réussite de l'accomplissement de la régénération cutanée. Les propriétés « idéales » sont illustrées dans la Table 6.

b) Le choix du HA

Depuis la découverte du HA en 1934, ses nombreux avantages ont attiré l'attention, le rendant un polymère très utilisé topiquement. L'idée de choisir le HA comme polymère de base pour la formulation d'une matrice cellulaire sous forme d'hydrogel dérive de ses nombreux avantages et bienfaits. Le HA a démontré avoir une grande versatilité lui permettant d'être utilisé dans différents domaines biomédicaux, tel que les soins de plaies chez les grands brûlés. D'ailleurs, le HA sous forme de gel est déjà utilisé sur les plaies (Ialugen®) au CHUV. Toutefois, aucun hydrogel de HA destiné à véhiculer des cellules chez les grands brûlés n'est effectivement présent sur le commerce.

Pour rappel, les propriétés bénéfiques du HA varient surtout en fonction de son poids moléculaire. Le HA est un élément clé pour initier, maintenir et finaliser la réponse tissulaire lors d'une inflammation. Le HA-HMW a plutôt un rôle structural, car il régule l'hydratation des tissus et protège les cellules contre des agressions externes (enzymes, UV, microbes). De nombreuses études ont démontré que le HA-LMW (<500 kDa) est pro-inflammatoire, en stimulant en autres l'angiogenèse, la migration cellulaire ainsi que l'activation des phagocytes. À noter que l'interaction entre le HA et les cellules se fait via deux récepteurs importants qui sont le CD44 et le RHAMM (Annexe d). Les puissantes capacités du HA-LMW sont donc dépendantes du taux de hyaluronidase produite dans les tissus car la fragmentation du HA est le déclencheur de la réponse inflammatoire. Parmi les nombreux articles, un seul contraste ces notions en disant que les effets pro-inflammatoires des oligomères de HA sont uniquement dus aux endotoxines qu'il contient dans la mesure où il n'est pas utilisé dans son état pur.(33) Davantage d'études devraient se pencher sur cette question afin de montrer les véritables effets du HA-LMW purifié.

Les nombreux avantages du HA sont illustrés dans la Table 6. Je tiendrai à souligner la complète biocompatibilité de ce biopolymère grâce au fait qu'il possède une structure moléculaire identique à travers les espèces, mêmes bactériennes. De plus, le HA se distingue de tous les autres également par son pouvoir hygroscopique qui le rend unique. Il est capable d'absorber 1000 fois son poids en eau et donc multiplier de 10'000 fois son volume. Cette capacité le rend parfait pour maintenir l'hydratation et les échanges d'oxygène et de nutriments dans les tissus.

c) L'encapsulation de cellules progénitrices fœtales

Le projet de créer une matrice sous forme d'hydrogel à base de HA et d'y encapsuler les CPF trouve ses fondements dans le rôle clé que peuvent jouer ces cellules.

Les cellules essentielles de la réparation tissulaire sont les kératinocytes et les fibroblastes. La réparation tissulaire lors de brûlures est un processus complexe comprenant plusieurs phases séquentielles, soient l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et finalement le remodelage tissulaire qui peut durer des semaines ou même des mois. (1)

Durant la phase inflammatoire, les fibroblastes sécrètent la matrice extracellulaire riche en collagène, de fibronectine et de laminine, qui fournit un environnement propice pour la différenciation endothéliale. Durant la phase proliférative, les kératinocytes, doivent se multiplier et migrer afin de former un nouvel épiderme. De plus, ils jouent un rôle essentiel en produisant le VEGF qui stimule l'angiogenèse et donc favorise l'oxygénation du tissu. (61) Le temps de la réparation tissulaire peut être minimisé si l'habileté de prolifération et de migration des kératinocytes est augmentée. (7) Le HA est en effet capable de favoriser la migration des cellules et d'induire la néo-vascularisation tissulaire.

Afin d'assurer une bonne survie des cellules dans un hydrogel de HA, il est important de bien maîtriser l'encapsulation des CPF. Dans la littérature, il est mentionné que ce processus devrait être effectué avant la réticulation du HA, c'est-à-dire sa transformation en un hydrogel, afin d'assurer l'homogénéité et la viabilité cellulaire. La viscosité de l'hydrogel est proportionnelle à la concentration de HA et plus le gel est visqueux, majeures sont les dégâts membranaires des cellules. C'est pourquoi, ce paramètre doit être bien pondéré afin de limiter la cytotoxicité de la solution tout en maintenant une intégrité mécanique adéquate de l'hydrogel. Une étude propose une concentration optimale de 5% de HA. (9) Il faut noter que la réticulation du HA requiert généralement de hautes températures, pouvant être délétères pour les cellules. Une étude a présenté une formulation intéressante permettant de transformer une solution rapidement en un hydrogel dans de conditions favorables. (57)

À noter qu'il existe déjà des produits à base de HA et de cellules tels que Hyalograft®, une membrane recouverte de fibroblastes, ainsi que Laserskin®, une membrane microperforée permettant de frayer un chemin aux kératinocytes jusqu'à la plaie. Ces membranes ont largement démontré leurs bienfaits et encouragent l'utilisation du HA et de cellules pour le traitement des brûlures. Toutefois, il n'existe pas encore de matrice de HA et de cellules sous forme d'hydrogel qui joue ce rôle, d'où l'intérêt d'approfondir les études dans cette direction.

d) L'application topique

L'hydrogel est un matériau pouvant être appliqué rapidement et facilement sur les plaies. La viscosité de l'hydrogel entre encore une fois en jeu lorsqu'on parle de son application topique. Dans la littérature, une viscosité aux alentours de 200-300 Pas permettrait une application aisée. (8) De même, l'élasticité du produit ne devrait pas être trop faible afin d'éviter que l'hydrogel ne s'écoule après son application. Le maintien de la forme et de la consistance sont donc des paramètres importants à considérer.

e) La dégradation de l'hydrogel

Un autre aspect important à considérer lors de la formulation d'un hydrogel de HA et de CPF est la dégradation de ce produit. La fragmentation du HA par les hyaluronidases sera dépendante du taux de l'enzyme et de son temps d'exposition avec le HA. Ce processus aura une influence considérable sur la survie des cellules contenues car elles perdront progressivement la barrière de protection fournie par l'hydrogel. À noter que les CPF elles-mêmes produisent la hyaluronidase, donc il faudrait évaluer leur taux de production au sein de l'hydrogel car la longue conservation du produit avec ces cellules encapsulées pourrait compromettre l'hydrogel. L'idéal serait que la dégradation du produit

puisse s'opérer à la même vitesse que la formation tissulaire. Une étude propose une dégradation idéale dans l'espace de 7 jours. (2)

f) Conclusion de la partie bibliographique

La littérature démontre l'importance du HA dans la MEC native et les nombreux bienfaits que nous pouvons tirer des naturelles et uniques propriétés de ce biopolymère. La formulation d'un pansement biologique sous forme d'hydrogel avec des CPF encapsulées implique de nombreux défis mais projette de multiples avantages et possibilités. Aucun article n'a véritablement mis en avant les éventuels désavantages de la susdite formulation. Cependant, nous pouvons en déduire la complexité et la délicatesse d'encapsuler des cellules dans un hydrogel, d'assurer leur viabilité et leur action biologique tout en maintenant les propriétés du HA dans un environnement dynamique qu'est la peau brûlée.

Table 6: Confrontation entre les caractéristiques du pansement biologique idéal pour les grands brûlés et l'hydrogel à base de HA en tant que matrice de support cellulaire.

Quelques caractéristiques du pansement biologique « idéal »	Est-ce que l' hydrogel à base de HA pourrait satisfaire ces critères ?	Commentaire	Réf.
Antibactérien	Possible	Le HA a un effet cytoprotecteur mais pour accentuer l'effet antibactérien, il est possible d'associer des produits bactériostatiques tels que la sulfadiazine d'argent par exemple.	(7)
Non-allergénique	✓	Dépourvu d'endotoxines	(7)
Le moins cytostatique possible	Possible	Cela dépend de la formulation du gel	(39)
Biocompatible	✓	Le HA est identique à travers les espèces	(7)
Retenir l'humidité	✓	Le pouvoir hygroscopique particulier du HA permet de retenir l'eau de façon importante. Prévention de la déshydratation du tissu et de la mort subséquente des cellules.	(7)
Cliniquement efficace	Possible	Selon la littérature, une efficacité a été démontrée in vivo. Cela dépend tout de même de la formulation du gel.	(22)
Non adhésif	✓	Les cellules ne s'attachent pas facilement aux surfaces hydrophiles telles que l'hydrogel. Cela permet de ne pas adhérer à la plaie, facilitant le changement du pansement chez le patient.	(2)
Surveillance clinique aisée	✓	L'hydrogel étant relativement transparent permet un monitoring continu.	(2)
Facilement applicable	✓	L'hydrogel est rapide et facile à appliquer dans différents endroits du corps, grâce à son élasticité.	(22) (2)
Tolérable pour le patient	✓	Les patients ont une sensation agréable sur la peau.	(7) (62)

5) Partie expérimentale

a) Matériel et méthodes

La partie expérimentale de ce travail a pour but de tester la survie des cellules progénitrices fœtales de la peau dans des gels de HA commerciaux à différentes concentrations. Le protocole suivi est celui employé par Grognuz et al. (2016) dans leur étude sur les gels de HA avec les cellules progénitrices de tendon. (54)

La même procédure a été effectuée en deux temps différents en employant plusieurs gels avec des concentrations de HA allant de 0.5 à 2% (Table 7). La première expérience (ici nommée expérience A) a employé des à 2%, 1.6% et 0.8% de HA (gels n° 1, 2, 4) et a été effectuée par une laborantine de l'Unité de Thérapie Régénérative du CHUV, tandis que j'ai effectué la deuxième expérience (ici nommée expérience B) en utilisant des gels à 1 et 0.8% de HA (gels n°3 et 4), les deux expériences ayant été exécutées en suivant le même protocole. Je vais décrire ci-dessous uniquement les détails de l'expérience B, que j'ai répétée 3 fois (EXP 1, 2 et 3). La liste des références du matériel utilisé se trouve dans l'annexe e).

Table 7: Sélection de gels de HA commerciaux

Gel	Concentration de HA	Fabricant
1. Ostenil	2%	TRB Chemedica, Haar, Allemagne
2. Synovial	1,6%	IBSA, Lodi, Italie
3. Ostenil mini	1%	TRB Chemedica, Haar, Allemagne
4. Synovial	0,8%	IBSA, Lodi, Italie
5. Viscoseal	0,5%	TRB Chemedica, Haar, Allemagne

i) Culture des cellules

Les fibroblastes fœtaux (FE002-SK2) proviennent de la banque cellulaire fabriquée suivant les normes GMP par l'unité de thérapie régénérative.

Les cellules ont étéensemencées à passage 6 (P6) dans une flasque de 75 cm² à une densité de 3000 cellules/cm². Elles ont proliféré pendant une semaine dans un milieu de culture complet composé de DMEM) 10% FBS, 1 % Glutamine sans supplément d'antibiotique, à l'intérieur d'un incubateur avec une température de 37°C et une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

ii) Mélange des gels commerciaux de HA avec les cellules

Après une semaine, les cellules ont été détachées avec du TrypleE et transférées dans un tube. Après 5 à 10 minutes de centrifugation (1200 RPM), le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de PBS. Le comptage cellulaire a été effectué dans une chambre de Neubauer, puis un volume précis de la solution a été prélevé afin de procéder au transfert de 40'000 cellules dans chaque puit d'une plaque à 12 puits. La même quantité de cellules a été transférée dans 4 puits distincts de 5 plaques différentes.

Nous avons ajouté 90 µl de gel dans chaque puit avec une pipette inversée. Deux puits ont reçu le gel Synovial 0,8% et deux autres le gel Ostenil mini 1%. Un mélange up and down a été effectué à l'aide de la pipette. La survie des cellules a été évaluée immédiatement après le mélange, à 24h (D1) et à 48h (D2). Les plaques D1 et D2 ont été conservées à 4°C emballées dans du papier d'aluminium.

La survie des cellules a été évaluée avec le kit LIVE/DEAD, qui va permettre de différencier les cellules mortes des cellules vivantes grâce à deux réactif fluorescents, l'EthDIII (coloration rouge des cellules mortes) et la calcein (coloration verte des cellules vivantes). En bref, les produits LIVE/DEAD; ont été décongelés et 2 µl de EthDIII ainsi que 0,5 µl de Calcein-AM ont été ajoutés dans un tube Eppendorf avec 1 ml de PBS. Par la suite, 100 µl de ce mélange ont été versés dans chacun des 4 puits et mélangés avec la point de la pipette. Les plaques ont été incubées 30 minutes à température ambiante, emballées dans du papier d'aluminium. Chaque expérience a été faite 3 fois en triplicat (EXP 1, 2 et 3).

iii) Analyse Live/Dead

Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques sont analysées avec un microscope à fluorescence IX81, équipé d'une caméra digitale. Les images ont été acquises avec un zoom de 35x, un gain à 2, une luminosité de 504 ms pour les images vertes et 1 seconde pour les rouges.

La quantification cellulaire a été effectuée à l'aide de l'application ImageJ. Les photos ont été mises en 8-bit et traitées avec la fonction « Find Maxima » (*point selection, noise tolerance : 10*) qui a effectué le comptage des cellules sur chaque photo. Tous les nombres de cellules ont été ensuite reportés dans un tableau Excel. Les résultats de la survie cellulaire sont résumés dans la Figure 13 et la Figure 14.

Finalement les photos rouge et verte ont été fusionnées avec la fonction « Merge channels » de ImageJ (Partie iii de l'Annexe g).

iv) Statistiques

Les résultats sont montrés sous forme de moyenne, une déviation standard a été calculée et un test t a été effectué pour démontrer une différence statistique entre les différentes expériences.

b) Résultats de la partie expérimentale

En s'inspirant de l'étude effectuée par Grognez et al. (2016) où la survie de ténocytes progéniteurs avait été évaluée dans différents gels à température ambiante et à 4°C sur 7 jours (54), une série d'expériences préliminaires de survie (expérience A) a été effectuée avec des fibroblastes progéniteurs fœtaux en utilisant 4 gels de HA : l'Ostenil 2%, le Synovial 1,6%, le Synovial 0,8% et le Viscoseal 0,5% sur 9 jours à 4°C. La meilleure survie cellulaire a été observée dans le Synovial 0,8%, conservé à 4°C (Annexe f). Au vu de ce résultat nous avons analysé la survie cellulaire dans des gels dont la concentration de HA était proche de 1%. Le Synovial 0.8% a été comparé à l'Ostenil mini 1% lors de la deuxième expérience (expérience B) afin de voir si une différence significative pouvait être mise en évidence entre ces deux étroites concentrations à température ambiante et à 4°C. Comme une diminution importante de la survie avait été observé dans les premiers jours de l'expérience (Annexe f) nous avons analysé la survie cellulaire sur une durée de 2 jours.

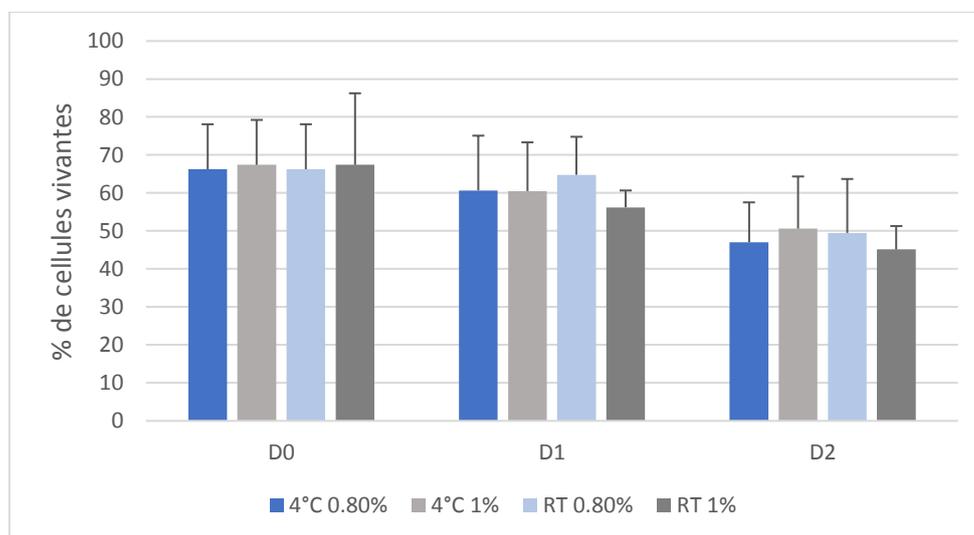


Figure 13: Taux de cellules vivantes (%) moyenne des EXP 1, 2 et 3 par jour de conservation (D0 = jour de l'expérience, D1 = Jour 1, D2 = Jour 2) et la température selon le % de HA et la température de conservation. (RT = température ambiante)

La Figure 13 montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les 2 gels quelle que soit la température de conservation de ceux-ci.

En revanche, une différence significative de la survie des cellules a été observée dans le temps quel que soit la température de conservation des gels avec les cellules (Figure 14).

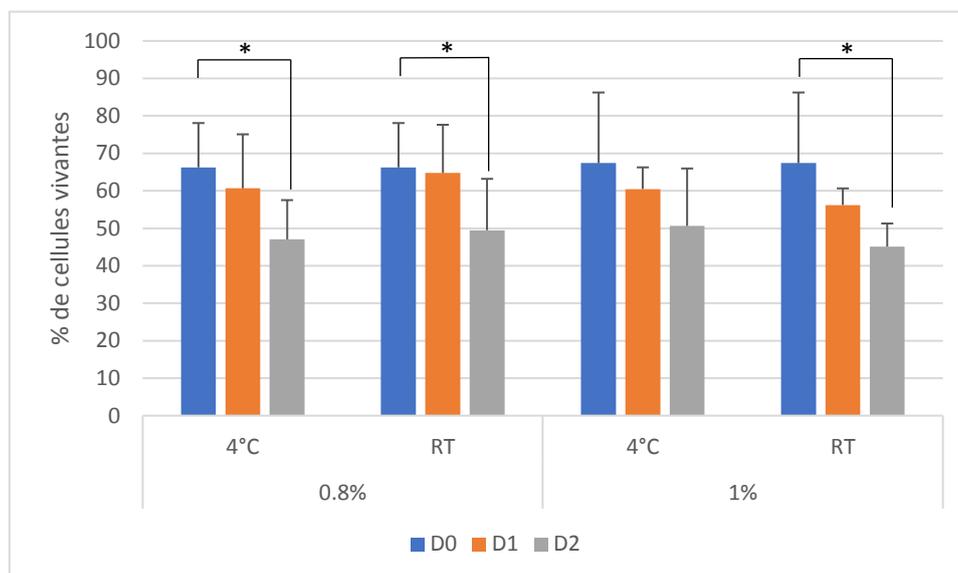


Figure 14: Taux de cellules vivantes (%) moyenne des EXP 1, 2 et 3 selon le % de HA et la température de conservation (RT = température ambiante). Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p > 0.05$). (D0 = jour de l'expérience, D1 = Jour 1, D2 = Jour 2)

Néanmoins nous avons observé une grande hétérogénéité dans la répartition des gels à l'intérieur des puits des plaques utilisées. De plus la répartition des cellules n'était pas la même suivant les puits (Partie iii et iv de l'Annexe g).

c) Discussion de la partie expérimentale

Les brèves expériences effectuées ne permettent pas de tirer beaucoup de réponses conclusives. Toutefois, leur exécution a permis de mettre en évidence différents aspects importants à considérer lors d'expériences futures, tels que l'optimisation des techniques de mélange des CPF et du gel et l'homogénéité de la répartition des cellules au sein de l'hydrogel. D'autres paramètres ont pu être soulevés, tels que la température de conservation et la concentration du gel de HA. Cette dernière semble bien devoir rester aux alentours de 0,8-1% afin d'optimiser la viabilité cellulaire.

6) Conclusion

L'association des bénéfices de l'hydrogel, des précieuses caractéristiques du HA et des puissantes propriétés biologiques des CPF semble apporter une synergie très prometteuse afin de créer un pansement biologique pouvant protéger les lésions, stimuler et faciliter la régénération tissulaire tout en étant agréable à appliquer topiquement chez les grands brûlés. Selon les résultats obtenus, il semble qu'une concentration aux alentours de 1% de HA dans le gel pourrait aboutir à un produit topique intéressant. Concernant le poids moléculaire spécifique du HA, il n'y a pas assez d'éléments pour pouvoir nous prononcer, car il faudrait également considérer les aspects techniques de production et de purification d'un gel de HA. Davantage d'expériences devront nécessairement être exécutées afin d'optimiser la tolérance des CPF vis-à-vis du gel et étudier ensuite in vivo l'effet de ce pansement biologique chez les grands brûlés, en considérant entre autres l'importance de la hyaluronidase.

7) Bibliographie

1. Costagliola M, Agrosi M. Second-degree burns: a comparative, multicenter, randomized trial of hyaluronic acid plus silver sulfadiazine vs. silver sulfadiazine alone. *Curr Med Res Opin.* agosto 2005;21(8):1235–40.
2. Madaghiele M, Sannino A, Ambrosio L, Demitri C. Polymeric hydrogels for burn wound care: Advanced skin wound dressings and regenerative templates. *Burns Trauma.* 2014;2(4):153.
3. Longinotti C. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: A review. *Burns Trauma.* 25 ottobre 2014;2(4):162.
4. Roessingh A de B, Guerid S, Que Y, Berger M, Hirt-Burri N, Scaletta C, et al. Cell Therapy Assistance in Reconstructive Surgery for Musculoskeletal Tissues Following Burn and Trauma: Swiss Cellular Transplantation Platform. *J Def Manag.* 30 marzo 2013;1–7.
5. BOUNOUIRA F. Les gels, aspects théoriques et applications [PhD Thesis]. UNIVERSITE MOHAMMED V – RABAT FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT; 2015.
6. Poinot M. L'acide hyaluronique : Production microbiologique et applications [Internet]. Université Henri Poincaré - Nancy 1 - Faculté de Pharmacie; 2011 [citato 23 febbraio 2017]. Available at: http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2011_POINSOT_MATHIEU.pdf
7. Guo X, Huang S, Sun J, Wang F. Comparison of the cytotoxicities and wound healing effects of hyaluronan, carbomer, and alginate on skin cells in vitro. *Adv Skin Wound Care.* settembre 2015;28(9):410–4.
8. Jones A, Vaughan D. Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. *J Orthop Nurs.* 2005;9:S1–S11.
9. Khademhosseini A, Eng G, Yeh J, Fukuda J, Blumling J, Langer R, et al. Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment. *J Biomed Mater Res A.* 1 dicembre 2006;79A(3):522–32.
10. Schmidt JJ, Rowley J, Kong HJ. Hydrogels used for cell-based drug delivery. *J Biomed Mater Res A.* 15 dicembre 2008;87A(4):1113–22.
11. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnol Bioeng.* 1 luglio 2009;103(4):655–63.
12. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* luglio 1997;242(1):27–33.
13. Lataillade J-J, Albanese P, Uzan G. [Implication of hyaluronic acid in normal and pathological angiogenesis. Application for cellular engineering]. *Ann Dermatol Venereol.* aprile 2010;137 Suppl 1:S15-22.
14. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions. *Acta Biomater.* aprile 2014;10(4):1558–70.
15. Kadi S. SYSTEMES ASSOCIATIFS A BASE D'ACIDE HYALURONIQUE MODIFIE: SYNTHÈSE ET ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE/PROPRIETES RHEOLOGIQUES [PhD Thesis]. Université de Grenoble; 2007.
16. Voigt J, Driver VR. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen.* 1 maggio 2012;20(3):317–31.
17. Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J Cosmet Laser Ther.* 1 gennaio 2008;10(1):35–42.
18. Gravante G, Sorge R, Merone A, Tamisani AM, Di Lonardo A, Scalise A, et al. Hyalomatrix PA in burn care practice: results from a national retrospective survey, 2005 to 2006. *Ann Plast Surg.* gennaio 2010;64(1):69–79.

19. Fino P, Spagnoli AM, Ruggieri M, Onesti MG. Caustic burn caused by intradermal self administration of muriatic acid for suicidal attempt: optimal wound healing and functional recovery with a non surgical treatment. *Il G Chir.* ottobre 2015;36(5):214–8.
20. Harris PA, di Francesco F, Barisoni D, Leigh IM, Navsaria HA. Use of hyaluronic acid and cultured autologous keratinocytes and fibroblasts in extensive burns. *Lancet Lond Engl.* 2 gennaio 1999;353(9146):35–6.
21. Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 1 ottobre 2007;60(10):1110–9.
22. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface.* 6 febbraio 2010;7(43):229–58.
23. Kavasi R-M, Berdiaki A, Spyridaki I, Corsini E, Tsatsakis A, Tzanakakis G, et al. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* marzo 2017;101:128–38.
24. Aya KL, Stern R. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* ottobre 2014;22(5):579–93.
25. Price RD, Myers S, Leigh IM, Navsaria HA. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *Am J Clin Dermatol.* 2005;6(6):393–402.
26. Bourguignon LYW, Ramez M, Gilad E, Singleton PA, Man M-Q, Crumrine DA, et al. Hyaluronan-CD44 interaction stimulates keratinocyte differentiation, lamellar body formation/secretion, and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* giugno 2006;126(6):1356–65.
27. Rayahin JE, Buhrman JS, Zhang Y, Koh TJ, Gemeinhart RA. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater Sci Eng.* 13 luglio 2015;1(7):481–93.
28. Albano GD, Bonanno A, Cavalieri L, Ingrassia E, Di Sano C, Siena L, et al. Effect of High, Medium, and Low Molecular Weight Hyaluronan on Inflammation and Oxidative Stress in an In Vitro Model of Human Nasal Epithelial Cells [Internet]. *Mediators of Inflammation.* 2016 [citato 13 ottobre 2018]. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/8727289/>
29. 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 β -Defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J Immunol.* 1 agosto 2008;181(3):2103–10.
30. Mesa FL, Aneiros J, Cabrera A, Bravo M, Caballero T, Revelles F, et al. Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. *Histol Histopathol.* 2002;17(3):747–53.
31. Safrankova B, Gajdova S, Kubala L. The Potency of Hyaluronan of Different Molecular Weights in the Stimulation of Blood Phagocytes. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1–9.
32. Weindl G, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC. Hyaluronic Acid in the Treatment and Prevention of Skin Diseases: Molecular Biological, Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Skin Pharmacol Physiol.* 2004;17(5):207–13.
33. Dong Y, Arif A, Olsson M, Cali V, Hardman B, Dosanjh M, et al. Endotoxin free hyaluronan and hyaluronan fragments do not stimulate TNF- α , interleukin-12 or upregulate co-stimulatory molecules in dendritic cells or macrophages. *Sci Rep [Internet].* 21 novembre 2016 [citato 7 marzo 2017];6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5116629/>
34. Presti D, Scott JE. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH \cdot) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass. *Cell Biochem Funct.* dicembre 1994;12(4):281–8.
35. Gall Y. Acide hyaluronique : structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. */data/revues/01519638/v137sS1/S0151963810700077/ [Internet].* 29 aprile 2010 [citato 27 settembre 2017]; Available at: <http://www.em-consulte.com/en/article/250425>

36. Fronza M, Caetano GF, Leite MN, Bitencourt CS, Paula-Silva FWG, Andrade TAM, et al. Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *PLoS One*. 2014;9(11):e112297.
37. Fouda MMG, Abdel-Mohsen AM, Ebaid H, Hassan I, Al-Tamimi J, Abdel-Rahman RM, et al. Wound healing of different molecular weight of hyaluronan; in-vivo study. *Int J Biol Macromol*. agosto 2016;89:582–91.
38. Thönes S, Kutz LM, Oehmichen S, Becher J, Heymann K, Saalbach A, et al. New E-beam-initiated hyaluronan acrylate cryogels support growth and matrix deposition by dermal fibroblasts. *Int J Biol Macromol*. 1 gennaio 2017;94:611–20.
39. Juhász I, Zoltán P, Erdei I. Treatment of partial thickness burns with Zn-hyaluronan: lessons of a clinical pilot study. *Ann Burns Fire Disasters*. 30 giugno 2012;25(2):82–5.
40. Brown MB, Jones SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. maggio 2005;19(3):308–18.
41. Xie Y, Upton Z, Richards S, Rizzi SC, Leavesley DI. Hyaluronic acid: evaluation as a potential delivery vehicle for vitronectin: growth factor complexes in wound healing applications. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 10 agosto 2011;153(3):225–32.
42. Das S, Baker AB. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. *Front Bioeng Biotechnol [Internet]*. 31 ottobre 2016 [citato 9 settembre 2018];4. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2016.00082/full>
43. Lee J, Jung J, Bang D. The efficacy of topical 0.2% hyaluronic acid gel on recurrent oral ulcers: comparison between recurrent aphthous ulcers and the oral ulcers of Behçet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1 maggio 2008;22(5):590–5.
44. Schlesinger T, Rowland Powell C. Efficacy and Safety of a Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Topical Gel in the Treatment of Facial Seborrheic Dermatitis Final Report. *J Clin Aesthetic Dermatol*. maggio 2014;7(5):15–8.
45. Koller J. Topical treatment of partial thickness burns by silver sulfadiazine plus hyaluronic acid compared to silver sulfadiazine alone: a double-blind, clinical study. *Drugs Exp Clin Res*. 2004;30(5–6):183–90.
46. Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials*. febbraio 2005;26(4):359–71.
47. Saddiq ZA, Barbenel JC, Grant MH. The mechanical strength of collagen gels containing glycosaminoglycans and populated with fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*. 1 giugno 2009;89A(3):697–706.
48. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sánchez L, Coto G. Hyaluronic Acid and Wound Healing. *J Pharm Pharm Sci*. 29 gennaio 2015;18(1):53–60.
49. Reitingner S, Lepperdinger G. Hyaluronan, a Ready Choice to Fuel Regeneration: A Mini-Review. *Gerontology*. 2013;59(1):71–6.
50. Su Z, Ma H, Wu Z, Zeng H, Li Z, Wang Y, et al. Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. *Mater Sci Eng C*. 1 novembre 2014;44:440–8.
51. Wu Z, Fan L, Xu B, Lin Y, Zhang P, Wei X. Use of Decellularized Scaffolds Combined with Hyaluronic Acid and Basic Fibroblast Growth Factor for Skin Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 1 gennaio 2015;21(1–2):390–402.
52. Prestwich GD. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *J Controlled Release*. 30 ottobre 2011;155(2):193–9.
53. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv Mater*. 25 marzo 2011;23(12):H41–56.

54. Grognoz A, Scaletta C, Farron A, Pioletti DP, Raffoul W, Applegate LA. Stability Enhancement Using Hyaluronic Acid Gels for Delivery of Human Fetal Progenitor Tenocytes. *Cell Med.* 14 gennaio 2016;8(3):87–97.
55. Ghosh K, Pan Z, Guan E, Ge S, Liu Y, Nakamura T, et al. Cell adaptation to a physiologically relevant ECM mimic with different viscoelastic properties. *Biomaterials.* febbraio 2007;28(4):671–9.
56. Kim BS, Choi JS, Kim JD, Yeo TY, Cho YW. Improvement of stem cell viability in hyaluronic acid hydrogels using dextran microspheres. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010;21(13):1701–11.
57. Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *J Controlled Release.* 2000;69(1):169–184.
58. Murphy SV, Skardal A, Atala A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J Biomed Mater Res A.* gennaio 2013;101A(1):272–84.
59. Huang D, Wang R, Yang S. Cogels of Hyaluronic Acid and Acellular Matrix for Cultivation of Adipose-Derived Stem Cells: Potential Application for Vocal Fold Tissue Engineering. *BioMed Res Int.* 2016;2016:6584054.
60. Witting M, Boreham A, Brodewolf R, Vávrová K, Alexiev U, Friess W, et al. Interactions of hyaluronic Acid with the skin and implications for the dermal delivery of biomacromolecules. *Mol Pharm.* 4 maggio 2015;12(5):1391–401.
61. Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. Hyaluronan Benzyl Ester as a Scaffold for Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 3 luglio 2009;10(7):2972–85.
62. Mahedia M, Shah N, Amirlak B. Clinical Evaluation of Hyaluronic Acid Sponge with Zinc versus Placebo for Scar Reduction after Breast Surgery. *Plast Reconstr Surg Glob Open [Internet].* 11 luglio 2016;4(7). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4977119/>
63. Bettinger DA, Mast B, Gore D. Hyaluronic acid impedes reepithelialization of skin graft donor sites. *J Burn Care Rehabil.* agosto 1996;17(4):302–4.
64. Liguori V, Guillemin C, Pesce GF, Mirimanoff RO, Bernier J. Double-blind, randomized clinical study comparing hyaluronic acid cream to placebo in patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* febbraio 1997;42(2):155–61.
65. Park JU, Tsuchiya T. Increase in gap junctional intercellular communication by high molecular weight hyaluronic acid associated with fibroblast growth factor 2 and keratinocyte growth factor production in normal human dermal fibroblasts. *Tissue Eng.* luglio 2002;8(3):419–27.