



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2010

FACULTE DE PHARMACIE

**LES ALGINATES ET LEURS APPLICATIONS
EN PHARMACIE ET EN INGENIERIE**

APPLICATION A LA CONSTRUCTION D'UN BIOMATERIAU

T H E S E

présentée et soutenue publiquement

le 02 juillet 2010

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Emilie VINCENT**
née le 19 février 1987 à Saint-Dié (88)

Membres du Jury

Président :	M. Pierre LABRUDE,	Professeur
Juges :	M. Patrick MENU,	Professeur
	M. Jean-Claude VOEGEL,	Directeur de recherche INSERM, Université Louis Pasteur, Strasbourg
	Mlle Hajare MJAHER,	Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, Stagiaire post-doctorale à l'UMR CNRS 7561.

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010
DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :
Pharmaceutique Hospitalier**

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL.....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE.....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL.....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU.....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE.....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD.....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND.....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER.....	Chimie Physique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ.....	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI	Toxicologie
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé et environnement Thierry

Olivier JOUBERT.....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER.....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAILOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER

Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD

Anglais

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET.....

Directeur

SERMENT DES APOTHICAIRES



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

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES
DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE
CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires (UMR 7561 CNRS-UHP). Aussi je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. le Dr. MAGDALOU, directeur de l'unité, et à M. le Pr STOLTZ, directeur du laboratoire, de m'avoir accueillie au sein de leur équipe de recherche.

Mes plus vifs remerciements s'adressent tout d'abord à M. le Pr Patrick MENU qui m'a accueillie à plusieurs reprises au sein de son équipe d'ingénierie vasculaire. C'est grâce à lui que j'ai pu en premier lieu effectuer un stage d'initiation à la recherche qui m'a donné le goût de la recherche et m'a permis de trouver ma voie. Ce stage a été suivi par mon inscription en master pour lequel il est mon directeur de recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mr le Pr. Pierre LABRUDE qui a accepté d'être mon directeur de thèse ainsi que mon président de jury. Je le remercie tout particulièrement pour sa disponibilité et son aide précieuse sans laquelle ce travail n'aurait pas pu être réalisé dans des délais aussi courts et sans fautes d'orthographe !!!!!

Je remercie vivement Melle le Dr MJAHED, Hajare pour nous tous au labo, d'avoir accepté de participer à mon jury mais je la remercie également pour tous les précieux conseils qu'elle m'a apportés au cours de ce travail.

Ma gratitude s'adresse également à M. le Dr Jean-Claude VOEGEL, très étroitement associé à notre équipe de recherche et très fréquemment présent à nos réunions, pour sa participation au jury et surtout pour les connaissances, les conseils, les avis qu'il m'a apportés au cours de mon travail.

Je ne saurais passer sous silence mes collègues de bureau : Aude, Estelle et Nicolas S., ceux qui faisaient presque partie du bureau : Tunay et Camille, et celui qui en a fait partie : Nicolas B., qui m'a encadré au début de mon master et dont j'ai pris la "succession", pour la science et pour les bons moments passés ensemble et les nombreux fous rire...Merci !

Enfin je remercie tous les membres du laboratoire : Brigitte, Céline, Dominique, Fatima, Ghislaine, Jessica, Karine, Leti, Loïc, Monique, Nacer, Nati, Philippe, Rania, Sébastien, Talar, pour leur accueil et leur bonne humeur,

Sans oublier bien sûr tous mes amis de la fac : Aurélie, Ellen, Pauline, Tiphanie,..., et ceux de la "maison" : la famille Baltzer, Jess, la famille Mischler,...

A TOUTE LA FAMILLE,

*A **Steph** qui m'a servi pendant 6 ans de "punching-ball" à l'approche des examens : Ca y est, c'est fini !!!*

*A **mes parents**, et **grands parents** pour leur soutien et leur nombreux encouragements,*

*A **ma sœur Coralie** qui a toujours été présente,*

*A **mes beaux-parents** qui sont devenus au fil du temps ma deuxième famille,*

*A **mes beaux-frères** Alex, Christophe et Gilles,*

*Sans oublier bien sûr **Valentine** !!*

Et tout le reste de la famille qu'il ne m'est pas possible de citer.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

PARTIE I : LES ALGINATES

I. Historique.....	2
II. Classification	3
III. Les différentes sources d'alginate	6
III.1. Les bactéries	6
III.1.a. Rôle de la production d'alginate chez les bactéries	6
III.1.b. Voie de synthèse de l'alginate chez les bactéries.....	7
III.2. Les algues	8
III.2.a. Intérêt	8
III.2.b. Voie de synthèse de l'alginate chez les algues	9
III.2.c. Description botanique des principales familles d'algues productrices d'alginate.....	10
IV. Propriétés physico-chimiques	15
IV.1. Définition de l'acide alginique selon la Pharmacopée Européenne, 6 ^{ème} édition	15
IV.2. Caractères organoleptiques issus de la Pharmacopée Européenne, 6 ^{ème} édition.....	15
IV.3. Identification	15
IV.4. Structure	16
IV.5. Propriétés physico-chimiques des alginates en solution-formation des gels d'alginate	17
IV.6. Les gels d'alginate et leurs propriétés	20
IV.7. Stabilité et dégradation des gels	22
V. Extraction de l'alginate.....	22
V.1. alginate de sodium	22
V.1.a. 1 ^{ère} technique : passage par l'acide alginique.....	23
V.1.b. 2 ^{ème} technique : passage par l'alginate de calcium.....	24
V.2. autres alginates.....	26
V.3. Autres paramètres importants de la production	26
V.3.a. Couleur	26
V.3.b. Approvisionnement en eau.....	27
V.3.c. Elimination des déchets.....	27
VI. Les différents emplois de l'alginate	28

PARTIE II : L'ALGINATE UN PRINCIPE ACTIF

<u>A/ LES PANSEMENTS CUTANES</u>	30
I. Les plaies	30
I.1. L'ulcère de jambe	30
I.1.a. Définition	30
I.1.b. Etiologies	30
I.1.c. Physiopathologie	31
I.1.d. Aspect clinique	32
I.1.e. Traitements	33
I.1.f. Complications	34
I.2. L'escarre	34
I.2.a. Définition	34
I.2.b. Physiopathologie	35
I.2.c. Les facteurs de risques	36
I.2.d. Classification	36
II. La cicatrisation	37
II.1. Définition	37
II.2. Physiologie de la cicatrisation	37
II.3. La cicatrisation dirigée	39
III. Les pansements	39
III.1. Le pansement "idéal"	39
III.2. Les différents types de pansements	40
III.3. Le choix du pansement	43
IV. Les pansements à l'alginate	44
IV.1. Composition et formes	44
IV.2. Propriétés	45
IV.3. Indications	45
IV.4. Mode d'utilisation	46
IV.5. Contre-indication, précaution d'emploi	46

<u>B/ LES PANSEMENTS HEMOSTATIQUES</u>	48
I. Physiologie de l'hémostase	48
I.1. Le système plaquettaire	48
I.2. Le rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire	49
I.2.a. L'adhésion plaquettaire	49
I.2.b. L'activation plaquettaire	50
I.2.c. L'aggrégation plaquettaire	50
II. La pathologie : l'épistaxis.....	51
II.1. Définition	51
II.2. Physiopathologie	52
II.3. Etiologies	52
II.4. Traitements	53
III. Les médicaments hémostatiques	53
III.1. Généralités	53
III.2. Les hémostatiques locaux	54
IV. Les hémostatiques locaux à base d'alginate	54
IV.1. Mécanisme d'action	54
IV.2. Composition et formes	55
IV.3. Indications	55
IV.4. Interactions- précautions d'emploi.....	56
 <u>C/ LES PANSEMENTS GASTRIQUES</u>	 57
I. Système digestif	57
I.1. Physiologie de la sécrétion gastrique.	57
I.2. Sécrétion acide chlorhydrique.	58
II. Pathologies.....	59
II.1. Le reflux gastro-œsophagien (RGO)	59
II.1.a. Définition	59
II.1.b. Physiopathologie	60
II.1.c. Clinique	60
II.1.d. Traitement	61

II.2. la maladie ulcéreuse : l'ulcère gastrique	62
II.2.a. Définition	62
II.2.b. Physiopathologie	62
II.2.c. Clinique	63
II.2.d. Complications.....	63
II.2.e. Traitement (figure 40)	64
III. Les médicaments des pathologies digestives	64
III.1. Les antisécrétoires	65
III.1.a. Les antiH2	65
III.1.b. Anticholinergiques	66
III.1.c. Les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP)	66
III.1.d. La somatostatine (SMT).....	67
III.2. Les antiacides	67
III.3. Les protecteurs de la muqueuse	68
IV. Les pansements gastriques	68
IV.1. Généralités-présentation	68
IV.2. Les pansements gastriques à base d'alginat	69
IV.2.a. Mécanisme d'action- Effet de l'alginat	69
IV.2.b. Indications	70
IV.2.c. Effets indésirables	70
IV.2.d. Précautions d'emploi – interactions médicamenteuses	70

PARTIE III : LES ALGINATES EN PHARMACIE GALENIQUE

<u>A/ LES ALGINATES : DES EXCIPIENTS</u>	71
I. Les excipients.....	71
I.1. Définition	71
I.2. Rôles des excipients	71
I.3. Propriétés des excipients	71
II. Les alginates : des excipients.....	72
II.1. Acide alginique	72
II.1.a. Chimie	72
II.1.b. Catégories d'excipients- les utilisations dans la formulation des médicament..	72

II.1.c.	Propriétés spécifiques de l'acide alginique	73
II.1.d.	Conditions de conservation et de stabilité.....	73
II.1.e.	Incompatibilités	74
II.1.f.	Données de sécurité-toxicité	74
II.1.g.	Précautions d'emploi.....	74
II.2.	Alginate de propylèneglycol	74
II.2.a.	Chimie	74
II.2.b.	Catégories d'excipients- utilisations dans la formulation des médicament	74
II.2.c.	Propriétés spécifiques de l'alginate de propylèneglycol	75
II.2.d.	Incompatibilités	75
II.2.e.	Conditions de conservation et de stabilité.....	75
II.2.f.	Données de sécurité-toxicité	75
II.2.g.	Précautions d'emploi.....	76
II.3.	Alginate de sodium	76
II.3.a.	Chimie	76
II.3.b.	Catégories d'excipients- utilisations dans la formulation des médicaments.....	76
II.3.c.	Propriétés spécifiques de l'alginate de sodium	77
II.3.d.	Incompatibilités	77
II.3.e.	Conditions de conservation et de stabilité.....	77
II.3.f.	Données sécurité-toxicité	77
II.3.g.	Précautions d'emploi.....	78
III.	Médicaments contenant l'alginate et ses dérivés comme excipient.....	78
III.1.	Liste des médicaments contenant la substance acide alginique comme excipient :....	78
III.2.	Liste des médicaments contenant l'alginate de sodium comme excipient :.....	79
 <u>B/ L'ALGINATE UN PROCEDE D'ENCAPSULATION</u>		80
I.	La micro-encapsulation.....	80
I.1.	Définition-Historique	80
I.2.	Rôle de l'encapsulation	80
I.3.	Mécanismes de libération des substances encapsulées dans des microcapsules.....	81
II.	L'alginate : support pour la microencapsulation	82
II.1.	Techniques d'encapsulation à partir d'alginates.....	83
II.1.a.	La coacervation complexe : procédé physico-chimique	83

II.1.b. Gélification de gouttes : procédé mécanique.	84
II.2. Applications : exemple de molécules encapsulées avec l'alginate	84

PARTIE IV : L'ALGINATE DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE

<u>A/ INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</u>	85
I. Les vaisseaux sanguins	85
I.1. Structure générale.....	85
I.1.a. Intima	85
I.1.b. Média.....	86
I.1.c. Adventice	87
I.2. Les cellules musculaires lisses (CML).....	87
I.2.a. Structure	87
I.2.b. Propriétés.....	88
I.2.c. Marqueurs de différenciation	89
II. Les biomatériaux	91
II.1. Définition	91
II.2. Alginate.....	91
II.3. Les films multicouche de polyélectrolytes	91
III. Ingénierie tissulaire	93
III.1. Définition.....	93
III.2. Rôle de l'ingénierie tissulaire dans l'athérosclérose	94
III.2.a. Construction par feuillet cellulaire	95
III.2.b. Applications de l'alginate dans l'ingénierie tissulaire	96
III.2.c.Applications des films multicouche de polyélectrolytes dans l'ingénierie tissulaire	96
<u>B/ MATERIEL ET METHODES</u>	99
I. Préparation du biomatériau	99
I.1. Préparation des lames de verre	99
I.2. Matériel	99
I.3. Protocole.....	100
I.4. Enroulement du gel	100
II. Méthode de caractérisation du biomatériau	101

II.1. Microscopie confocale a balayage laser	101
II.2. Mesure de la viscosité des solutions d'alginate	102
II.2.a. Principe de fonctionnement.....	102
II.2.b. Protocole.....	102
 <u>C/ RESULTATS</u>	104
I. Mise au point de l'architecture à base du gel d'alginate et de films multicouches de polyélectrolytes	104
I.1. Formation d'un gel d'alginate à la surface d'une lame de verre	104
I.2. Elaboration d'une membrane de gel d'alginate détachable.....	105
I.2.a. Gels simples	105
I.2.b. Gels stratifiés.....	106
I.3. Elaboration de l'architecture stratifiée à base de gel d'alginate et de films multicouches de polyélectrolytes	107
I.3.a. Visualisation de l'architecture en microscopie optique : topographie	107
I.3.b. Epaisseur de l'architecture stratifiée	108
I.4. Enroulement du gel d'alginate	109
I.5. Quelques tests mécaniques préliminaires sur le rouleau du gel d'alginate.....	110
II. Suite du travail.....	111
 <u>D/ DISCUSSION - PERSPECTIVES</u>	112
I. Discussion	113
II. Perspectives	115
III. Conclusion.....	117
 CONCLUSION	118
ANNEXES	120
BIBLIOGRAPHIE	127

TABLE DES FIGURES

PARTIE I : LES ALGINATES

Figure 1 : portrait d'E.C.C. Stanford.....	2
Figure 2 : monosaccharides présents dans les différents polysaccharides des algues	5
Figure 3 : schéma simplifié de leur paroi des algues brunes.....	6
Figure 4 : voie de synthèse de l'alginate chez les algues brunes	9
Figure 5 : mécanisme d'action de la C5-épimérase.	10
Figure 6 : classification phylogénétique des principales espèces d'algues productrices d'alginate	11
Figure 7 : <i>Laminaria digitata</i>	12
Figure 8 : <i>Fucus vesiculosus</i> et <i>Fucus serratus</i>	13
Figure 9 : <i>Macrocystis pyrifera</i>	14
Figure 10 : monomères de mannuronate M et de guluronate G	16
Figure 11 : polymère d'alginate constitué des monomères M et G liés en 1-4.....	16
Figure 12 : liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate.	18
Figure 13 : rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly- G définissant une structure de type "egg-box"	19
Figure 14 : effet de l'ajout de calcium dans une solution d'alginate.....	20
Figure 15 : réseaux de gels formés à partir d'alginate possédant des blocs d'acide guluronique de longueurs différentes	21
Figure 16 : premières étapes de l'extraction de l'alginate chez les algues brunes : obtention d'une solution d'alginate de sodium	23
Figure 17 : extraction de l'alginate de sodium à partir de la solution obtenue lors de la première étape : technique de l'acide alginique	24
Figure 18 : extraction de l'alginate de sodium à partir de la solution obtenue lors de la première étape : technique de l'alginate de calcium	25
Figure 19 : insert oculaire contenant de l'alginate : Ocusert®	29
Figure 20 : moulage du visage réalisé avec de l'alginate	29
Figure 21 : billes d'alginate contenant un colorant vert ainsi qu'un arôme pour la cuisine moléculaire.....	29

PARTIE II : L'ALGINATE UN PRINCIPE ACTIF

Figure 22 : ulcère veineux au niveau de la jambe.	31
Figure 23 : ulcère de jambe à prédominance artérielle sur le dos du pied	32
Figure 24 : eczéma variqueux.....	32
Figure 25 : schéma de l'écrasement des capillaires impliquant une hypoxie tissulaire responsable de la formation de l'escarre	34
Figure 26 : Escarre talonnière au stade d'ulcère bourgeonnant	35
Figure 27 : schéma du cisaillement, facteur de risque de survenue de l'escarre	36
Figure 28 : plaie en phase de granulation présentant un aspect rouge vif en raison de la formation de néo-capillaires assurant la nutrition du tissu.	38
Figure 29 : plaie en phase d'épidermisation	38
Figure 30 : compresse d'alginate et pansement Algostéril®	41
Figure 31 : structure d'un thrombocyte au repos et son activation à la suite d'une brèche vasculaire.	49
Figure 32 : l'hémostase : aspects moléculaires de l'adhésion, de l'activation et de l'aggrégation plaquettaire.....	51
Figure 33 : fosses nasales présentant une tache vasculaire conduisant à un épistaxis	52
Figure 34 : mèche d'alginate (Coalgan®).....	55
Figure 35 : coupe de la muqueuse stomacale et détail des différentes cellules qui la composent.	57
Figure 36 : schéma des différents paramètres de la sécrétion acide gastrique et certaines interférences médicamenteuses favorisant la production acide ou s'y opposant	59
Figure 37 : schéma de la remontée acide dans l'œsophage au cours du RGO	60
Figure 38 : physiopathologie de l'ulcération	62
Figure 39 : ulcère gastrique vu par endoscopie	63
Figure 40 : arbre décisionnel de la prise en charge d'un ulcère gastrique	65
Figure 41 : pansement gastrique en suspension buvable.....	69

PARTIE III : LES ALGINATES EN PHARMACIE GALENIQUE

Figure 42 : représentation de l'acide alginique	72
Figure 43 : représentation de l'alginate de propylèneglycol.....	74
Figure 44 : représentation de l'alginate de sodium	76
Figure 45 : microcapsules d'alginate observées au microscope électronique à balayage	80
Figure 46 : représentation schématisée du processus de coacervation complexe.	83
Figure 47 : procédé de gélification de gouttes d'alginate et structure atomique d'une bille d'alginate	84

PARTIE IV : L'ALGINATE DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE

Figure 48 : structure de la paroi d'une artère	86
Figure 49 : structure d'une cellule musculaire lisse.....	87
Figure 50 : observation en microscopie	88
Figure 51 : représentation de CML de phénotype différencié (contractile) et dédifférencié (de synthèse).	89
Figure 52 : principe de la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes	92
Figure 53 : structure chimique des polyélectrolytes utilisés. PAH: poly (allylamine – hydrochloride); PSS : poly (sodium 4-styrène sulfonate).....	92
Figure 54 : concept d'ingénierie tissulaire	93
Figure 55 : vaisseaux synthétiques en ePTFe.....	94
Figure 56 : ingénierie vasculaire : construction par feuillet cellulaire.	98
Figure 57 : flacon pulvérisateur "air-boy"	99
Figure 58 : technique d'enroulement du feuillet cellulaire	100
Figure 59 : principe de fonctionnement du microscope confocal	101
Figure 60 : viscosimètre Low shear 30 et le principe de Couette	102
Figure 61 : dépôt d'un gel d'alginate de viscosité moyenne coloré au bleu de trypan sur lame de verre.	106
Figure 62 : architecture finale développée	107
Figure 63 : aspect de la surface du gel.	108
Figure 64 : observation au microscope à contraste de phase (objectif x40) des stries réalisées dans le gel d'alginate à la suite de la modification de la technique de pulvérisation ...	108
Figure 65 : mesure de l'épaisseur de gel d'alginate de viscosité moyenne.....	109
Figure 66 : enroulement du biomatériau final non cellularisé.....	110
Figure 67 : réalisation de tests mécaniques succincts.	110

TABLE DES TABLEAUX

PARTIE I : LES ALGINATES

Tableau 1 : différents types de colloïdes existant en fonction des deux phases en présence.... 4

Tableau 2 : proportion variable des différents blocs MG, MM et GG en fonction des
différentes espèces d'algues 17

PARTIE II : L'ALGINATE UN PRINCIPE ACTIF

Tableau 3 : tableau décisionnel pour le choix du pansement en fonction de l'échelle colorielle
de la plaie et de l'importance de l'exsudat..... 44

Tableau 4 : différents pansements à base d'alginate remboursés par la sécurité sociale..... 45

PARTIE III : LES ALGINATES EN PHARMACIE GALENIQUE

Tableau 5 : principaux matériaux, les procédés utilisables et quelques exemples d'application
de la microencapsulation 82

INTRODUCTION

Les alginates, peu connus du grand public, sont pourtant des produits aujourd'hui utilisés dans de nombreux domaines. Chacun de nous les consomme ou les utilise régulièrement sans même le savoir. Cette lacune vient notamment du fait de l'incompréhension des ingrédients contenus dans les produits commercialisés qui s'avère un défi compliqué en raison de l'utilisation de nombreux symboles. En effet, comment peut-on deviner à quoi correspond l'ingrédient E400 sur une étiquette ?

Les emplois des alginates sont nombreux et concernent de multiples industries. Ils sont utilisés dans l'industrie textile, alimentaire, pharmaceutique, dans l'imprimerie,... mais toutes ces industries y trouvent une propriété commune : la capacité de gélification de ce produit naturel, origine qui est très bien perçue actuellement dans notre société.

Le travail bibliographique réalisé au cours de cette thèse permettra de caractériser les différents alginates et leurs propriétés physico-chimiques. Nous verrons comment ces propriétés peuvent être appliquées dans les produits industriels.

Les emplois que nous détaillerons seront axés sur l'ingénierie, qu'elle soit pharmaceutique ou tissulaire :

- Nous préciserons plus particulièrement les emplois en pharmacie. En effet l'industrie pharmaceutique est un gros consommateur d'alginates pour sa production de médicaments, que ce soit en tant que principe actif ou pour la réalisation des médicaments en tant qu'excipient ou matériau pour la microencapsulation.

- Enfin un travail de recherche viendra enrichir les parties précédentes. Il y sera développé les applications des alginates dans l'ingénierie vasculaire. Ce travail consiste à mettre au point un biomatériau fonctionnalisé à base d'alginate afin de créer un feuillet de cellules musculaires lisses en vue de l'obtention d'un substitut vasculaire nécessaire au remplacement d'un vaisseau dans l'athérosclérose.

PARTIE I :

LES ALGINATES

I. Historique

Le « découvreur » de l'alginate est Edward C. C. Stanford (figure 1).

E. C. C. Stanford (1837-1899) est un pharmacien et chimiste britannique.

Fils de pharmacien, il a été élève de l'école de la « Pharmaceutical Society » où il a reçu en 1857 des médailles sur tous les sujets d'enseignement et où il fut démonstrateur (assistant) chez le Pr Redwood. Il devint ultérieurement membre à vie de la « Pharmaceutical Society », son entrée dans la société datant de 1860.

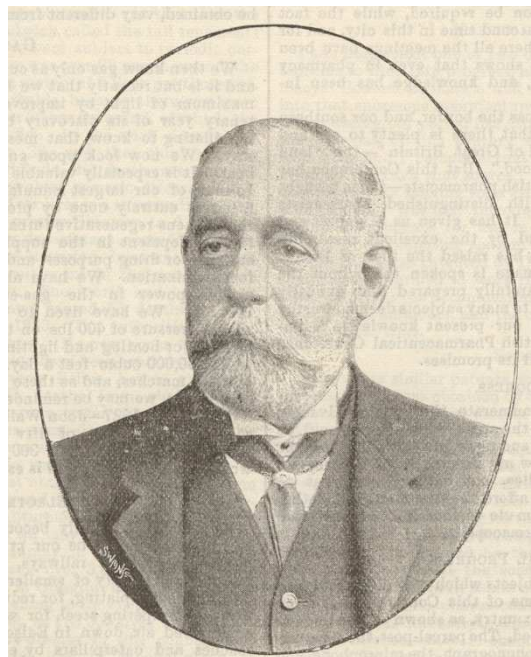


Figure 1 : portrait d'E.C.C. Stanford

Il fut aussi l'un des fondateurs de la Conférence pharmaceutique britannique dont il fut le président au congrès d'Edimbourg en 1892 (cf. extrait de la conférence de 1892 en annexe).

Il a également été membre de l'Institut de chimie et de la Société chimique, ainsi que juge de paix du comté du Dumbarton.

Il était très original et ingénieux, il avait toujours de nouvelles idées en tête et il concevait des appareils et des procédés. Il était un exemple typique de pharmacien impliquant ses connaissances de chimie dans une large gamme d'activités en dehors de la pratique pharmaceutique ordinaire.

Sa conférence sur les emplois économiques des algues marines devant la « Society of arts » en novembre 1862 attira l'attention et il reçut pour cette présentation la médaille d'argent de la société.

Il s'installa en Ecosse en 1863 et il y devint un grand connaisseur de la côte ouest de l'Ecosse et des Hébrides qu'il avait fréquemment visitées dans la cadre de son métier en relation avec la préparation de l'iode et d'autres produits issus des algues marines. Puis, en 1864, il fonda l'industrie écossaise des algues.

Il avait collecté de nombreux renseignements sur les substances utilisées par les habitants de ces régions en tant que colorants et aussi en tant que médicaments. Il a manifesté une grande attention à l'utilisation des algues du large et ceci le conduisit à breveter un procédé de préparation de l'alginate à partir de ces végétaux (notamment des laminaires) par diverses techniques, en particulier le bicarbonate de sodium, et en vue d'usage médicaux : l'alginate de fer étant l'un des sels le plus insipides de ce métal, le goût de ce métal étant gênant pour les usages pharmaceutiques.

Une de ses dernières recherches a porté sur les composés iodés de la thyroïde de laquelle il a extrait une préparation réputée contenir le principe total de la glande dans sa combinaison naturelle, la thyroxine (Pharm. J., 1899,1964).

II. Classification

Les alginates sont classés dans les colloïdes. En effet, le mot colloïde désigne toute substance comportant deux phases distinctes, et dont les particules d'une phase, discontinue, sont très petites, et diffusent dans l'autre phase. On distingue différentes catégories de colloïdes selon la nature des phases en présence.

Dans le cas de l'alginate, la phase dispersée correspond à une phase liquide alors que le milieu correspond à une phase solide afin d'obtenir un gel, tout comme la gélatine qui est également, comme on peut le voir sur le tableau 1, un colloïde.

Pour préciser la classification on peut définir l'alginate et la gélatine comme des hydrocolloïdes car ils sont solubles dans l'eau où ils se dissolvent pour former un gel avec des propriétés rhéologiques particulières.

Lorsque un colloïde est issu d'algues, on parle de phycocolloïdes. Une des sources majeures de la production d'alginate est une extraction à partir de certaines algues qui seront cités dans les paragraphes suivants. On peut donc également regrouper l'alginate dans les phycocolloïdes.

Les principaux colloïdes extraits des algues sont des polysaccharides qui constituent généralement la matrice extracellulaire de ces organismes.

Tableau 1 : différents types de colloïdes existant en fonction des deux phases en présence
(d'après <http://fr.wikipedia.org/wiki/Colloïde>)

Milieu / Phase		Phase dispersée		
		<u>Gaz</u>	<u>Liquide</u>	<u>Solide</u>
Milieu continu	<u>Gaz</u>	Aucun (Tous les gaz sont <u>miscibles</u>)	<u>Aérosol</u> liquide Exemples : <u>brouillard</u> , <u>brume</u> , <u>nuage</u>	<u>Aérosol</u> solide Exemples : <u>fumée</u> , <u>particules aériennes</u>
	<u>Liquide</u>	<u>Mousse</u> Exemples : <u>crème fouettée</u> , <u>mousse au chocolat</u>	<u>Émulsion</u> Exemples : <u>lait</u> , <u>mayonnaise</u> , savon liquide	<u>Sol</u> Exemples : <u>peinture</u> , <u>encre</u>
	<u>Solide</u>	Mousse solide Exemples : <u>aérogel</u> , <u>polystyrène expansé</u> ,	<u>Gel</u> Exemples : <u>gélatine</u> , <u>gelée</u> , <u>fromage</u> , alginate	Sol solide Exemple : verre

Les polysaccharides sont des polymères doués d'une capacité de gélification. En effet il est nécessaire que ces végétaux soient relativement flexibles en raison de leur environnement. En milieu marin la gravité exercée sur ces végétaux est différente de celle observée sur les végétaux terrestres.

A l'heure actuelle trois principales classes d'algues sont utilisées et chacune d'entre elle possèdent ses polysaccharides caractéristiques :

- l'acide alginique et les fucanes pour les Phaeophyceae
- les carraghénanes et l'agar-agar (géluse) des Rhodophyceae
- les polysaccharides complexes des Chlorophyceae.

La constitution de chacun de ces polysaccharides varie et on retrouve des monosaccharides différents pour chaque type comme l'indique la figure 2.

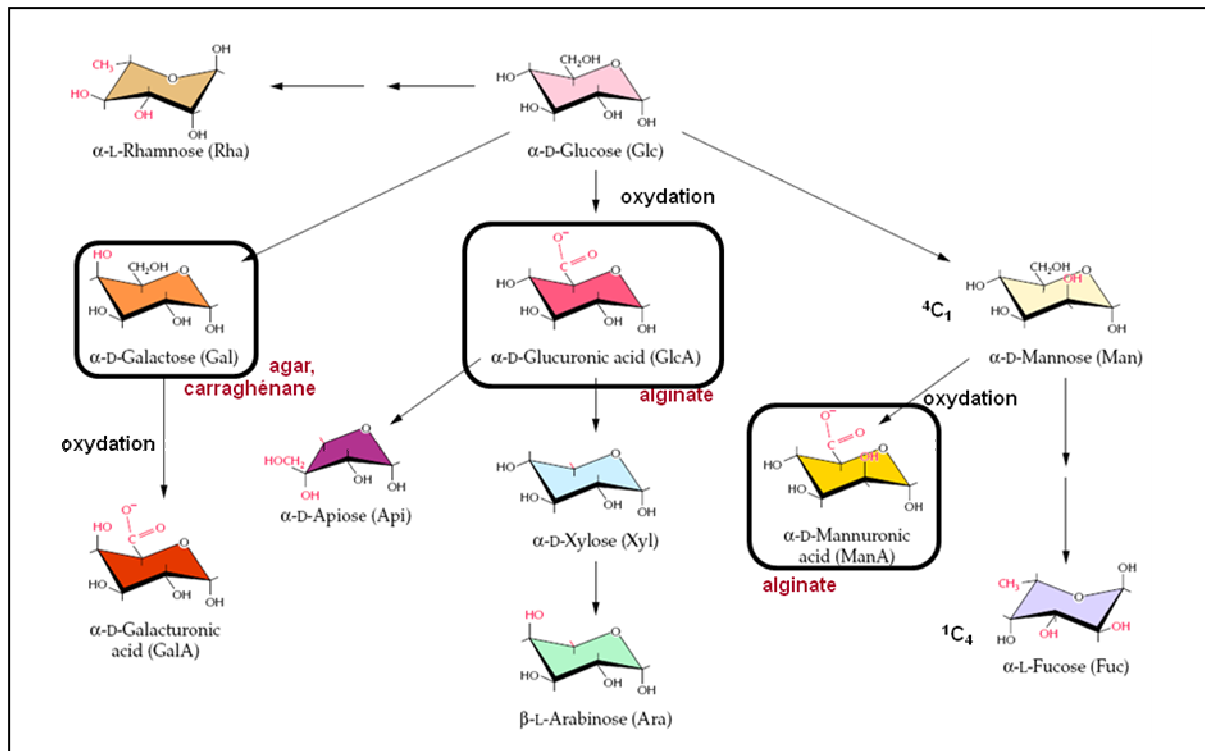


Figure 2 : monosaccharides présents dans les différents polysaccharides des algues
(Jouanneau, 2010)

D'autres polymères sont également présents comme la cellulose des Chlorophyceae, les mannanes, les xylanes, l'hémicellulose, les pectines, ect (Bruneton, 1999).

Les polysaccharides cités ci-dessus sont considérés comme des polysaccharides structuraux puisqu'ils définissent la structure principale de ces végétaux et constituent principalement la paroi des végétaux (figure 3).

Cependant à côté de ces derniers polysaccharides, il existe des polysaccharides nommés de réserve tels que l'amidon par exemple.

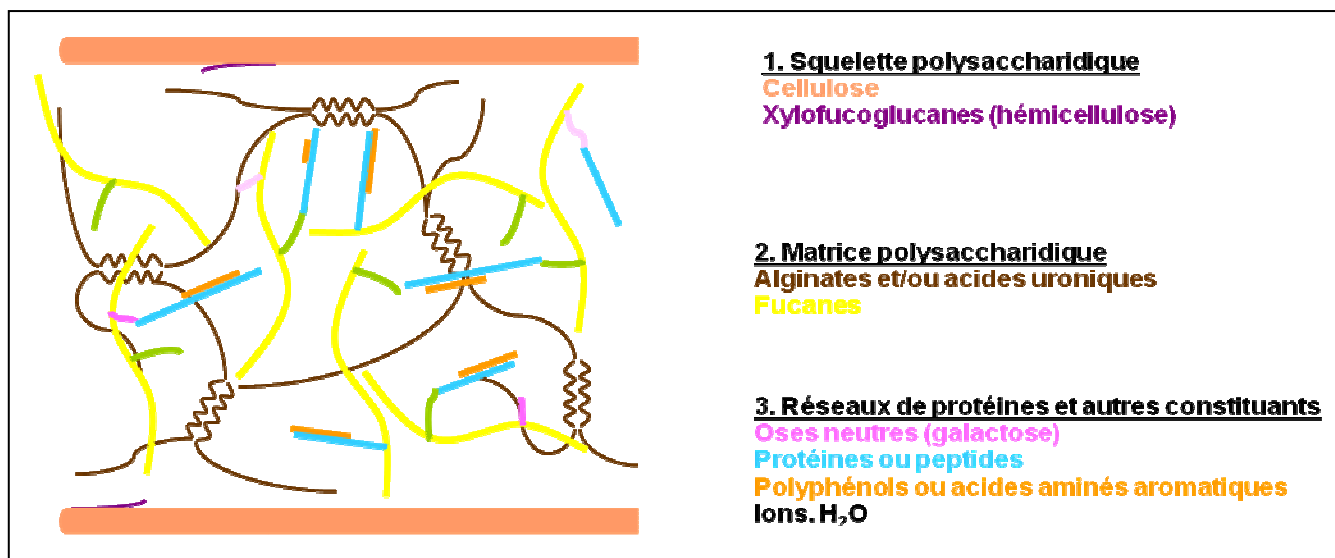


Figure 3 : schéma simplifié de leur paroi des algues brunes (Jouanneau, 2010)

III. Les différentes sources d'alginate

On trouve deux sources principales d'alginate : les bactéries et essentiellement les algues brunes.

III.1. Les bactéries

III.1.a. Rôle de la production d'alginate chez les bactéries

L'alginate peut être produit par des bactéries aérobies fixatrices d'azote telles que *Azobacter vinelandii* et la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*.

La production à partir d'algues brunes est beaucoup plus courante de par son prix beaucoup plus attractif qu'à partir des bactéries. Cependant cette technique est dépendante des conditions climatiques et de pollution ; c'est pourquoi la commercialisation d'alginate bactériens issus d'*A. vinelandii* se développe. De plus, la production bactérienne permet une parfaite maîtrise de la structure de la chaîne polymère grâce au progrès de la génomique (Mjahed, 2009).

Dans le cas des bactéries, seule *A. vinelandii* est utilisable car elle est la seule à produire un alginate présentant des structures de type copolymères en blocs.

La production d'alginate par les bactéries présente pour les bactéries elle-mêmes un rôle très important de protection. Le polysaccharide forme une capsule visqueuse, composée majoritairement d'alginate et d'un autre exopolysaccharide qui entoure *P. aeruginosa* et lui permet de se protéger de l'action non spécifique des cellules phagocytaires, de la déshydratation et des antibiotiques.

Les alginates représentent l'un des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, en provoquant l'augmentation de l'adhérence de la bactérie sur les cellules de l'épithélium trachéobronchique. De plus, l'augmentation de la viscosité du mucus par la présence de ces exopolysaccharides tend à diminuer l'activité ciliaire et donc l'élimination du mucus pulmonaire infecté.

Les alginates, en formant une capsule autour de la bactérie, vont la protéger de l'action des antibiotiques, et lui permettre d'échapper au système immunitaire et à la phagocytose (<http://www.ephe.univ-montp2.fr/>)

III.1.b. Voie de synthèse de l'alginate chez les bactéries

La biosynthèse de l'alginate chez *Pseudomonas aeruginosa* se réalise en deux étapes successives :

- La première étape utilise la voie de Enter-Doudoroff, voie secondaire du métabolisme du glucose : le produit d'arrivée de cette voie est le fructose-6-phosphate. La particularité de cette voie métabolique chez *P. aeruginosa* est son caractère cyclique qui permet la formation de fructose-6-phosphate alimentant la voie de biosynthèse des alginates à partir du cycle de Krebs.

- La deuxième partie est identique à celle décrite pour les algues : le fructose-6-phosphate est transformé en alginate par une cascade enzymatique (voir plus loin 2.b).

III.2. Les algues

III.2.a. Intérêt

L'utilisation des algues est une pratique courante et ancienne en Extrême-Orient notamment dans l'alimentation : au Japon on consomme régulièrement du Nori (préparation à partir de *Porphyra*), du Kombu (*Laminaria* séchés), ou encore du Wakame (*Undaria* salés ou séchés).

La consommation en France, bien qu'encore marginale, croît de façon régulière de même qu'en Europe. En effet, ces végétaux suscitent un intérêt croissant du fait de leur pauvreté en lipides et de leur richesse en polysaccharides non digestibles (souvent reconnus comme fibres alimentaires) et en éléments minéraux (tels que l'iode, le fer) et vitamines.

Pour exemple la France a reconnu en 1990, onze espèces d'algues comme légumes occasionnels ou comme condiments dont notamment : *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, ... Cependant ces algues doivent répondre à une réglementation bien particulière et principalement à des critères toxicologiques et microbiologiques précis : taux limité en arsenic, iode, cadmium, mercure, coliformes, *Clostridium*.

C'est pourquoi la production mondiale d'algues est en constante augmentation et représente aujourd'hui 90% de l'approvisionnement du marché. En 2005 la production mondiale représentait 7,8 millions de tonnes d'algues brunes et 4,8 millions d'algues rouges. Les principaux pays producteurs sont la Chine, l'Indonésie, le Japon et les Philippines.

Les algues présentent également un intérêt économique intéressant. Le principal marché des algues est l'industrie agro-alimentaire. En effet ces végétaux sont une source importante de polysaccharides aux propriétés épaississantes et gélifiantes. La production à la fin des années 1980 représentait 55000 tonnes d'alginate, d'agar-agar et de carraghénanes (Bruneton, 2009).

La pharmacie est également une industrie qui s'intéresse de près aux algues pour les propriétés rhéologiques des gels obtenus avec ces colloïdes. Cependant elle s'intéresse également aux propriétés thérapeutiques des métabolites secondaires tels que les terpénoïdes, les polyphénols halogénés ou les substances azotées.

Bien d'autres débouchés s'offrent aux algues également : l'industrie agricole pour la production de fertilisants, la cosmétique, la thalassothérapie, ...

III.2.b. Voie de synthèse de l'alginate chez les algues (figure 4)

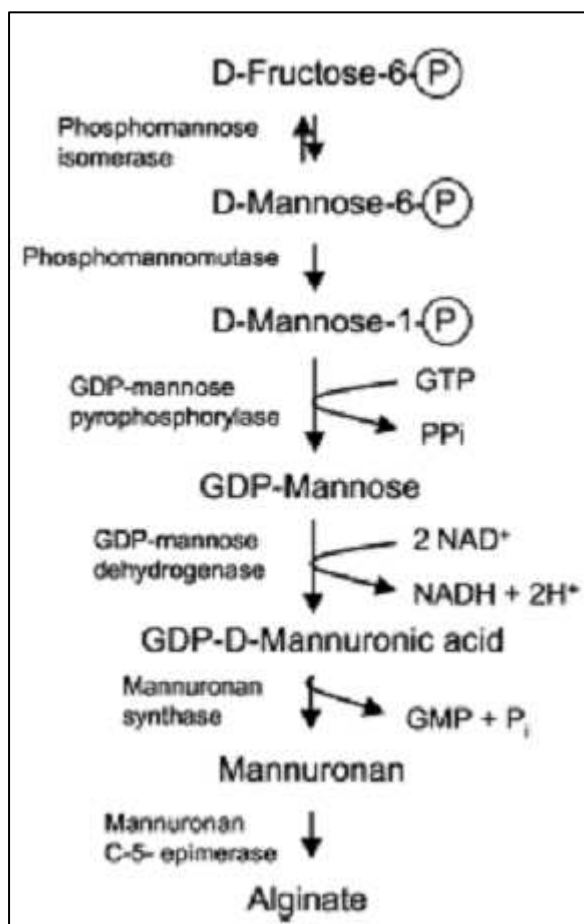


Figure 4 : Voie de synthèse de l'alginate chez les algues brunes (Jouanneau, 2010)

Le fructose-6-phosphate (voir 1.b.) est converti en alginate lors de cette deuxième étape.

Les étapes de biosynthèse débutent par la conversion en mannose-6-phosphate par la phosphomannose isomérase. La phosphomannomutase (PMM) intervient dans la deuxième étape en catalysant la conversion du mannose-6-phosphate en mannose-1-phosphate en présence de glucose 1-6-di-phosphate.

Puis une troisième enzyme, la GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP) catalyse la formation de GDP-mannose par fixation d'un GTP sur le mannose-1-phosphate. Le GDP-mannose déshydrogénase (GMD), dernière enzyme cytoplasmique connue de la chaîne de biosynthèse, catalyse la double oxydation du GDP-mannose en GDP-mannuronate avec la réduction de 2 NAD⁺.

Par la suite, l'acide mannuronique va être converti en mannuronane par action de la mannuronane synthase qui va entraîner la libération d'une molécule de GMP et d'un phosphate inorganique.

Pour former de l'alginate, une enzyme très importante entre en jeu : la mannuronane C5-épimérase qui permet la transformation du mannuronane en alginate. Cette épimérase

permet la conversion d'une conformation « M » du mannuronate en conformation « G », c'est-à-dire en guluronate (figure 5).

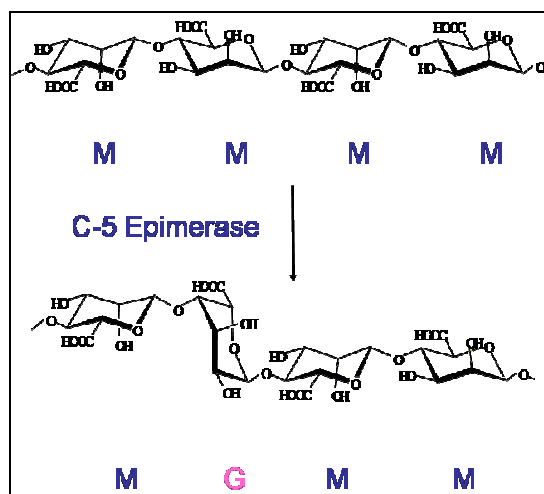


Figure 5 : mécanisme d'action de la C5-épimérase (Jouanneau, 2010).

III.2.c. Description botanique des principales familles d'algues productrices d'alginate (Bruneton, 1999 et Paris, 1976).

L'alginate de sodium, substance mucilagineuse issue des algues brunes, est un polysaccharide naturel. Les principaux organismes constitués d'alginate sont les algues brunes. En effet ces dernières en sont constituées pour plus de 40 % de leur poids sec et le produit constitue le polysaccharide le plus abondant de ces organismes.

L'acide alginique est un constituant quasiment constant chez les *Phaeophyceae*. Cette classe regroupe les algues benthiques ou pélagiques dont les plastes renferment de la chlorophylle a et c, du β -carotène et des xanthophylles spécifiques (fucoxanthine), dont la matrice intercellulaire est essentiellement constituée d'alginate et de fucanes et dans les vacuoles cellulaires desquelles laminarianes et mannitol accompagnent des dérivés du phloroglucinol.

Les principales algues dont est extrait l'alginate sont celles qui appartiennent aux familles des Laminaires et des Lessoniaceae (figure 6).

L'alginate contenu dans les algues est un mélange d'alginate de calcium, sodium et potassium.

Laminaires, macrocystis et fucus sont les principaux genres actuellement utilisés pour l'obtention, par l'industrie, de l'acide alginique et des alginates. D'autres *Phaeophyceae* sont également utilisables pour la production d'acide alginique : elles appartiennent aux genres *Ascophyllum*, *Ecklonia*, *Nereocystis*, *Durvillea*.

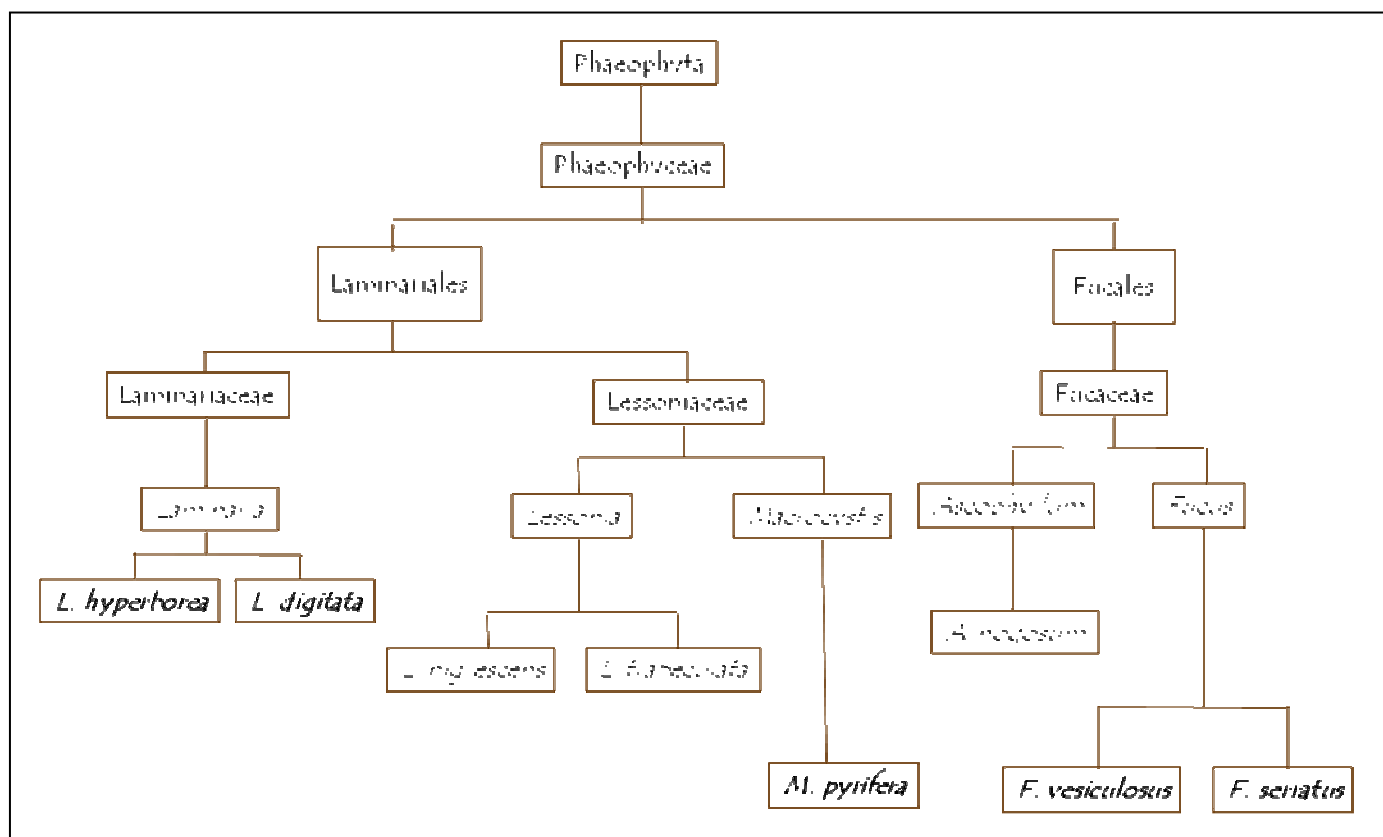


Figure 6 : classification phylogénétique des principales espèces d'algues productrices d'alginate (Jouanneau, 2010)

➤ Laminaires, *Laminaria* spp., *Laminariaceae*

Les principales espèces utilisées sont *Laminaria digitata* et *Laminaria hyperborea*. Les laminaires sont des algues de grande taille, de couleur brun olivâtre. Le stipe (figure 7) adhère aux roches par des crampons fixateurs et le thalle peut atteindre 2 à 3 mètres de long. Chez les deux espèces citées ci-dessus, il est large à la base, puis divisé en lanières plus ou moins larges. Le stipe des laminaires gonfle fortement dans l'eau et son diamètre peut atteindre 10

fois celui du stipe sec. Ce sont les cellules de la zone moyenne qui gonflent en s'hydratant, mais le stipe conserve sa forme et une certaine rigidité en raison des cellules de l'assise externe à parois épaisses.

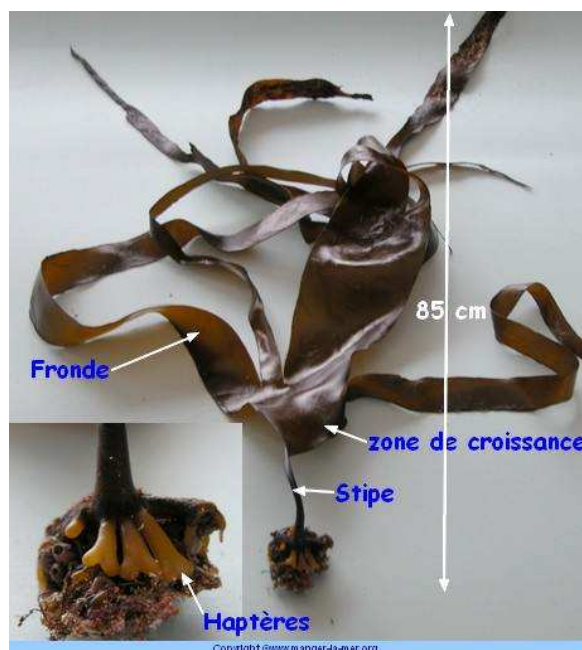


Figure 7 : *Laminaria digitata*

<http://manger-la-mer.org/>.

La plante sèche renferme moins de 1% de lipides, 5% de protides et 65% au moins de glucides.

Ceux-ci sont représentés par :

- du mannitol en quantité importante (12 à 15%)
- des glucides condensés solubles (15 à 40%) :
 - o fucoïdane (cf. fucus) ;
 - o laminarane. La teneur en laminarane varie beaucoup au cours de la végétation. Presque nulle au début du printemps, elle augmente en été, est maximale en septembre (jusqu'à 35% du poids sec). Elle peut être extraite par un acide dilué et précipite par neutralisation.
- de l'algine : 15 à 40% du poids sec. Les laminaires sont parmi les plus importantes matières premières pour la préparation de l'alginate.

➤ *Fucus, Fucaceae*

Les deux principales espèces utilisées sont *Fucus serratus* L. et *Fucus vesiculosus* L. (figure 8).



Figure 8 : *Fucus vesiculosus* et *Fucus serratus*

<http://www.biopix.com/> <http://abacus.bates.edu/>

Ces algues pérennes abondent sur les côtes des mers tempérées et froides de l'hémisphère Nord. En Manche, elles colonisent l'espace de balancement des marées.

Les frondes forment des lames foliacées de 20 centimètres à 1 mètre de long, d'un brun plus ou moins olivâtre ; linéaires à la base, elles sont ramifiées dichotomiquement et parcourues par une nervure médiane. Chez *F. serratus*, la marge est découpée en dents de scie ; à l'extrémité des frondes existent des conceptacles à anthéridies et archégonies, renflés et visqueux. Chez *F. vesiculosus*, il y a tout le long des nervures des vésicules aérifères, ovoïdes ou circulaires.

Lors de la récolte, on ramasse le goémon de rive rejeté par les flots et on arrache le goémon de rive ou de fond à marée basse, aux grandes marées d'automne. Le tout est ensuite séché au soleil.

La drogue sèche se présente alors comme des lames noirâtres de consistance cornée avec des efflorescences blanchâtres à odeur de marée et à saveur mucilagineuse. Le thalle séché de ces deux espèces est par ailleurs inscrit à la 10^{ème} édition de la Pharmacopée française. A l'état sec, ces algues renferment encore 10 à 12% d'eau mais également 15% de matières minérales, 1 à 2% de lipides, 4 à 5% de protides et environ 65% de glucides.

De plus ces algues sont constituées :

- de cellulose en petite quantité ;
- d'algine qui représente 18 à 28% du poids sec ;
- de fucoïdane : ce glucide de réserve, soluble dans l'eau, est constitué par des unités de L-fucose liées en 1-2 sous forme α -glucosidique et portant des groupes esters sulfuriques en C4 ;
- de laminariane (cf. laminaires).

Par ailleurs, les fucus ont une teneur appréciable en vitamine C et provitamine A.

➤ Macrocystis, Lessoniaceae

La principale espèce utilisée dans cette famille est *Macrocystis pyrifera* (figure 9). Elle appartient aux algues géantes (50 à 100 m) de l'océan Pacifique.

Elles sont plus particulièrement présentes sur les côtes californiennes, où 120.000 tonnes sont récoltées chaque année.

Cette algue présente une lame divisée en folioles unilatérales à base renflée en une vésicule creuse qui assure la flottaison en surface. La division de la lame se poursuit dans le stipe, donnant à celui-ci un aspect ramifié.



Figure 9 : *Macrocystis pyrifera*

www.picsdigger.com

IV. Propriétés physico-chimiques

IV.1. Définition de l'acide alginique selon la Pharmacopée Européenne, 6^{ème} édition. 2006.

« L'acide alginique est un mélange d'acides polyuroniques $[(C_6H_8O_6)_n]$ constitués par des résidus de l'acide D-mannuronique et de l'acide L-guluronique. Il est obtenu principalement à partir d'algues appartenant à la famille des Phéophycées. Une petite proportion des groupes carboxyles de l'acide alginique peut être salifiée. L'acide alginique contient au minimum 19,0% et au maximum 25,0% de groupes carboxyles (COOH), la teneur étant calculée par rapport à la substance desséchée. ».

IV.2. Caractères organoleptiques issus de la Pharmacopée Européenne, 6^{ème} édition

« L'acide alginique est une poudre cristalline ou amorphe, blanche ou brun-jaune pâle, très peu soluble dans l'eau et pratiquement insoluble dans l'alcool et dans les solvants organiques. Il gonfle dans l'eau mais ne s'y dissout pas. Il se dissout dans les solutions d'hydroxydes alcalins. »

Ses sels monovalents sont quant à eux parfaitement hydrosolubles.

IV.3. Identification

La 6^{ème} édition de la Pharmacopée européenne prévoit 3 tests d'identification : deux tests de gélification et un test de coloration :

- les tests de gélification montrent que l'alginate mélangé dans de l'eau et du carbonate de sodium prend en masse en présence de chlorure de calcium mais ne se gélifie pas en présence de sulfate de magnésium.

- le test de coloration montre que l'alginate en milieu aqueux, alcoolique et acide en présence de 1,3-dihydroxynaphtalène et à chaud donne une couleur rouge-bleue intense extractible par l'éther isopropylique.

IV.4. Structure

L'acide alginique est un polymère linéaire constitué de deux acides uroniques, l'acide D-mannuronique (M) et l'acide L-gulonique (G) (figure 10).

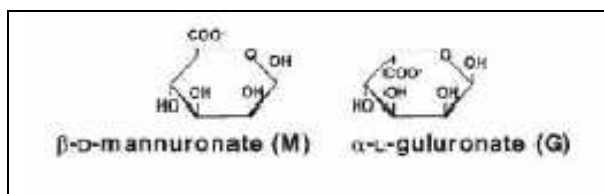


Figure 10 : monomères de mannuronate M et de guluronate G (Jouanneau, 2010)

Ce polymère est constitué de plusieurs unités dont le nombre varie de 100 à 3000. La liaison entre les monomères est de type β -(1-4). Ces acides sont présents dans le polymère sous forme de blocs homogènes poly-M ou poly-G séparés par des régions où ils peuvent alterner (G-M-G-M...) (figure 11).

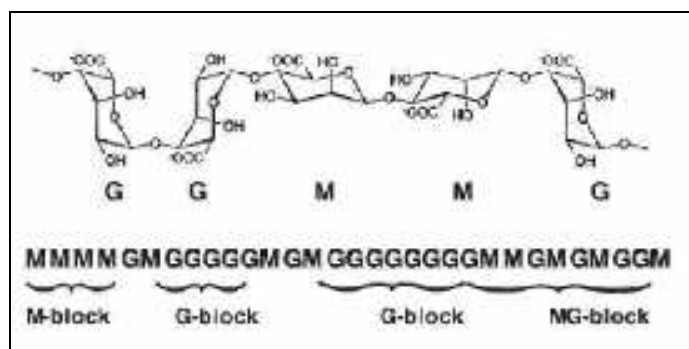


Figure 11 : polymère d'alginate constitué des monomères M et G liés en 1-4. L'alternance des monomères forme différents types de blocs : MM, MG, GG (Jouanneau, 2010).

A l'état natif, l'alginate existe sous forme de sels mixtes (sodium, magnésium, calcium,...) dont une partie doit être liée aux fucanes.

Les proportions relatives des deux acides varient selon l'origine « botanique » de l'alginate (tableau 2). La longueur des blocs, leurs proportions et leurs séquences sont également déterminées par l'identité botanique de l'échantillon considéré et par de nombreux autres facteurs : date de récolte, partie de la plante utilisée (stipe, fronde, réceptacle,...).

Tableau 2 : proportion variable des différents blocs MG, MM et GG en fonction des différentes espèces d'algues (<http://www.fmcbiopolymer.com/>).

Type of Seaweed		%MM	%MG & GM	%GG
Available from FMC	<i>Laminaria hyperborea</i> (stem)	17	26	57
	<i>Laminaria hyperborea</i> (leaf)	36	38	26
	<i>Lessonia nigrescens</i>	40	38	22
	<i>Lessonia trabeculata</i>	25	26	49
	<i>Durvillaea antarctica</i>	56	26	18
	<i>Laminaria digitata</i>	43	32	25
	<i>Eclonia maxima</i>	38	34	28
	<i>Macrocystis pyrifera</i>	38	46	16
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	44	40	16
	<i>Laminaria japonica</i>	48	36	16

La proportion, la distribution et la longueur des blocs détermine les propriétés physico-chimiques des molécules d'alginate.

IV.5. Propriétés physico-chimiques des alginates en solution-formation des gels d'alginate (Stecquert, 2002).

Les propriétés physico-chimiques des solutions et des gels d'alginate en milieux aqueux dépendent de leur structure, c'est-à-dire de la proportion de résidus mannuroniques par rapport aux résidus guluroniques (rapport noté M/G) ainsi que du nombre et de la longueur des blocs MM, GG et MG.

La solubilité des alginates en solution aqueuse dépend du degré d'ionisation des groupements carboxyliques portés par les unités monomères. Ainsi, les alginates monovalents sont parfaitement solubles dans l'eau si on leur associe des cations alcalins monovalents car les groupements carboxyliques présents dans les molécules d'alginate sont ionisés. Par contre, l'acide alginique est insoluble dans les solutions aqueuses. Il précipite quand le pH est inférieur à 3,5.

On peut parler de pKa de l'acide alginique. L'acide mannuronique a un pKa de 3,38 et l'acide guluronique un pKa de 3,65. Le pKa apparent de l'acide alginique varie de 3,7 à 4,2 en fonction de sa composition.

Les solutions aqueuses d'alginate sont très visqueuses. En effet, l'alginate est un polyélectrolyte qui contient des fragments poly(α -L-guluronate) rigides. La relative rigidité de l'alginate se traduit par un rayon de giration¹ élevé en solution. La présence de groupements chargés sur la chaîne et le rayon de giration élevé expliquent la viscosité relativement élevée de l'alginate. Cette propriété des alginates est utilisée dans l'industrie : ils servent d'épaississant, surtout dans l'industrie agro-alimentaire.

Les alginates de sodium se dissolvent dans l'eau en formant des solutions colloïdales visqueuses à comportement pseudoélastique et ce pour de faibles concentrations. L'addition progressive de cations divalents (Ca^{2+} par exemple) provoque la formation d'un gel élastique, non thermoréversible : les segments guluroniques à conformation plissée retiennent les ions calcium par coordination, en coopérant avec une chaîne parallèle.

Les ions calcium s'associent préférentiellement aux fragments poly-guluronate plutôt qu'aux fragments poly-mannuronate (figure 12). En effet, les blocs poly-guluronate, en raison

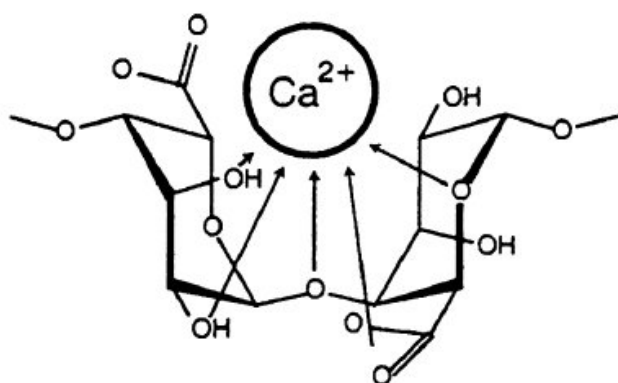


Figure 12 : liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G des polymères d'alginate (Stequert, 2009).

de leur conformation spatiale, permettent une chélation plus énergétique des ions. Ces derniers sont retenus dans une « cage » et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles. Les ions calcium sont beaucoup mieux retenus que par de simples liaisons ioniques.

Cet enchaînement régulier de type « egg box » (figure 13) se reproduit périodiquement : il se forme un réseau tridimensionnel à zones organisées reliées par les segments poly-M ou poly-(M-G).

¹ distance moyenne entre une extrémité de la chaîne et le centre de masse de la structure

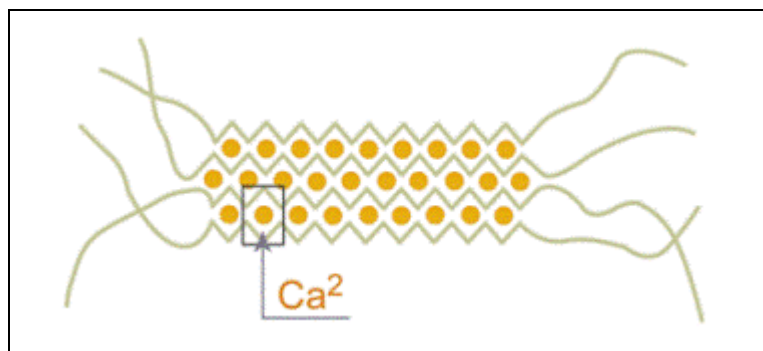


Figure 13 : rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "egg-box" (www.cargilltexturizing.com/).

La structure du polymère est donc l'élément déterminant du comportement rhéologique des gels d'acide alginique : la proportion des blocs poly-G et leur longueur conditionnent la formation et la force des gels obtenus en présence de calcium. On peut d'ailleurs remarquer que, *in vivo*, les tissus les plus anciens dans l'évolution et les plus résistants sont aussi les plus riches en acide L-gulonique.

Dans le cas de la gélification avec les ions calcium, il existe trois états physiques différents selon la concentration de cet élément. A très faible concentration, il y a formation d'agrégats (microgel) qui provoquent une diminution de la viscosité de la solution d'alginate. Puis à partir d'une certaine concentration, les macromolécules se réarrangent pour former un réseau tridimensionnel (gel continu) (figure 14). Si la concentration en calcium augmente encore, on observe un phénomène de synérèse² (gel continu avec démixtion) dû à une diminution du taux de gonflement des chaînes d'alginate avec expulsion d'eau hors du réseau.

Par ailleurs certaines études ont montré que la gélification de l'alginate dans une solution ne contenant que des ions calcium conduit à la formation d'un gel non homogène. En effet, la diffusion des ions calcium provoque une gélification de « billes » d'alginate de l'extérieur vers l'intérieur. L'alginate a alors tendance à migrer vers la zone de gélification. De ce fait, il s'établit un gradient de concentration en alginate à l'intérieur du gel. C'est un phénomène que l'on souhaite éviter, car il complique singulièrement le calcul du coefficient de diffusion.

² séparation d'un liquide de son gel.

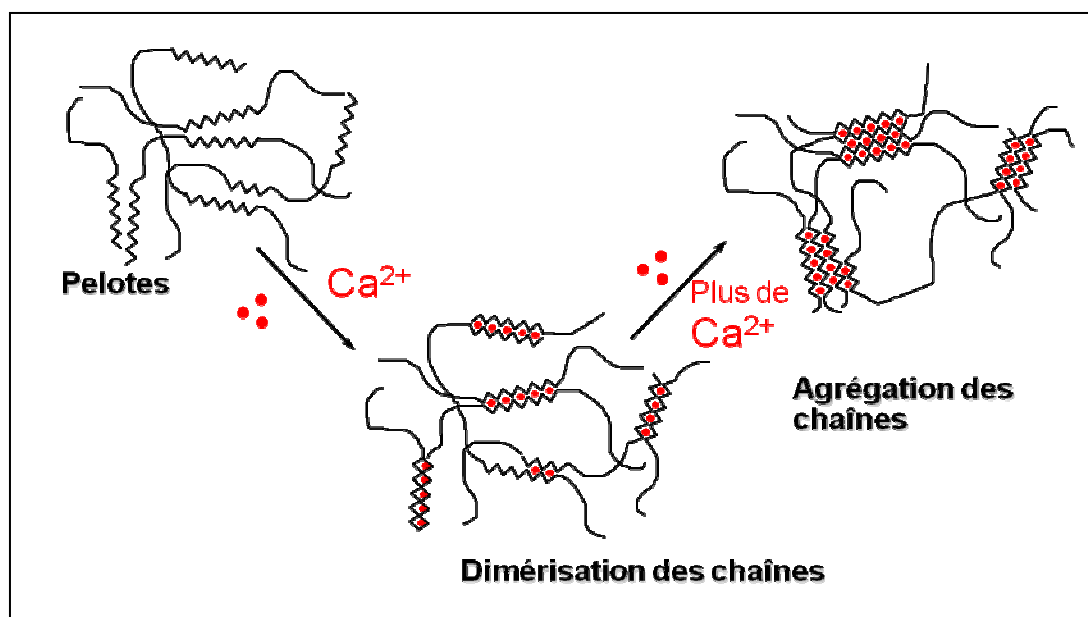


Figure 14 : effet de l'ajout de calcium dans une solution d'alginate : en haut à gauche les polymère polyM et polyG ne sont pas reliés. Avec l'ajout d'une concentration faible en calcium, on observe un assemblage des chaînes. En haut à droite cette figure montre que plus on ajoute de calcium, plus le réseau tridimensionnel est lié et donc rigide (Jouanneau, 2010)

Pour obtenir un gel homogène, il faut ajouter du chlorure de sodium à la solution de chlorure de calcium qui sert à gélifier l'alginate, ainsi qu'à la solution d'alginate. Ainsi l'alginate n'a plus tendance à se déplacer vers la zone de gélification, car la présence d'ions sodium conduit à un équilibre des charges.

IV.6. Les gels d'alginate et leurs propriétés (Mjahed, 2009).

La gélification de l'alginate peut s'effectuer par diffusion ou dialyse ou par processus interne.

Dans le premier cas, les ions calcium diffusent dans la solution ou au travers des membranes de dialyse, méthode qui est appliquée pour la formation de gels de grandes dimensions. La diffusion est surtout utilisée pour l'obtention de billes, de fibres et de films ou lorsque le gel est employé pour immobiliser des cellules ou pour améliorer les propriétés organoleptiques d'aliments.

La seconde méthode, la gélification interne, est très employée dans l'industrie alimentaire. Pour cela, des ions calcium « inactivés » par chélation ainsi qu'un agent retardateur sont mélangés à la solution d'alginate. L'agent retardateur libère des protons qui permettent de libérer des ions calcium dans la solution, d'où l'appellation de gélification interne.

Les paramètres physico-chimiques importants des gels sont : la rigidité, la densité du réseau, les phénomènes de « gonflement/dégonflement », la nature chimique de l'ion divalent, le rapport mannuronate/guluronate dans l'alginate, sa masse moléculaire et sa concentration.

En ce qui concerne l'ion divalent, il peut être classé dans l'ordre décroissant suivant l'affinité ci-après : $Pb = Cd > Ba > Ca = Sr \gg Mg$.

Par ailleurs l'affinité pour ces métaux varie selon la constitution de l'alginate : l'affinité est supérieure pour les alginates riches en guluronate. Les polymères blocs GG contractent une liaison forte avec le calcium, supérieure à celle des autres blocs. La présence de tel blocs influence les propriétés rhéologiques des gels et la vitesse de diffusion des solutés en leur sein. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les longs blocs GGG associés à de courts segments élastiques génèrent la formation d'un réseau ouvert, rigide et statique, alors que les gels à faible taux de guluronate se caractérisent par de longs segments élastiques et des structure dynamiques (figure 15).

L'augmentation de la concentration de l'alginate, surtout s'il est de masse moléculaire élevée, induit une plus grande rigidité du gel. Enfin les conditions de gélification influent sur les propriétés mécaniques : il existe une relation entre la température et la rapidité de la gélification : une température basse est responsable d'une diminution de la diffusion du calcium d'où une gélification plus lente, une structure plus ordonnée et donc une plus grande cohésion.

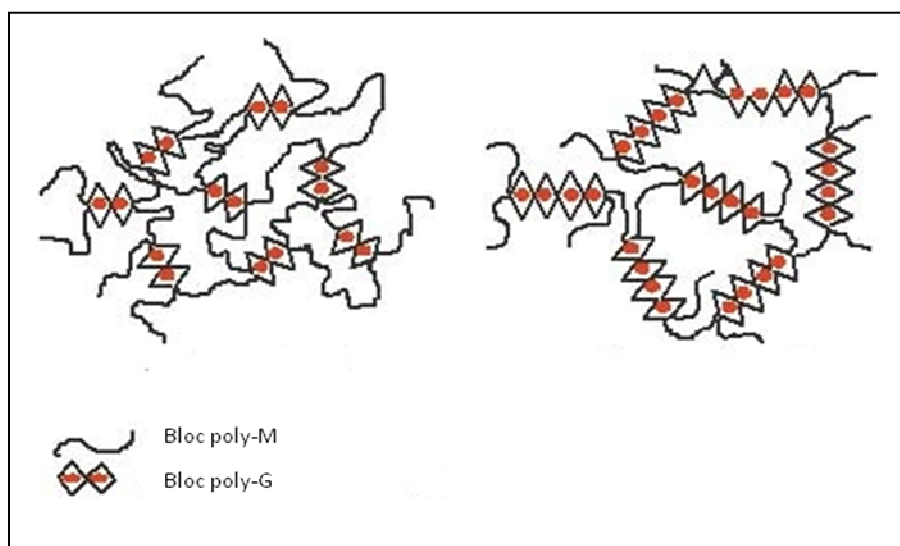


Figure 15 : réseaux de gels formés à partir d'alginate possédant des blocs d'acide guluronique de longueurs différentes : à gauche, taux de M élevé ; à droite, taux de G élevé conduisant à un réseau mieux organisé et plus rigide.(http://www.genialab.de/inventory/jpeg/alginate_network.jpg)

IV.7. Stabilité et dégradation des gels

Les gels d'alginate de calcium ne sont pas solubles dans l'eau. Toutefois cette dissolution peut s'obtenir si l'on déplace les ions calcium par un chélatant ou par de fortes concentrations de sodium ou magnésium. En effet le déplacement du calcium diminue la réticulation du gel et accroît son instabilité. Il est également possible de traiter les gels par des tampons phosphate 0,1M ou citrate 0,1M.

A l'inverse cette dissolution peut être empêchée par la présence en solution d'ions calcium libre dans un rapport adéquat. Les gels peuvent aussi être dégradés par hydrolyse acide.

V. Extraction de l'alginate (<http://www.fao.org/>)

V.1. alginate de sodium

Selon l'algue utilisée et les produits désirés, plusieurs techniques sont possibles. Pour récupérer l'alginate de sodium, il existe deux techniques.

Les premières étapes (figure 16) consistent à broyer l'algue sèche puis à la mettre en suspension dans une solution chaude de carbonate de sodium pendant environ deux heures. Au cours de cette étape l'alginate se dissout sous forme d'alginate de sodium. Les résidus des algues sont ensuite retirés. La solution étant très visqueuse, il est nécessaire de la diluer pour pouvoir la filtrer.

Après filtration on obtient une solution d'alginate de sodium. Les étapes ci-dessus sont communes aux deux techniques. Les étapes suivantes diffèrent et consistent à faire précipiter l'alginate de la solution filtrée.

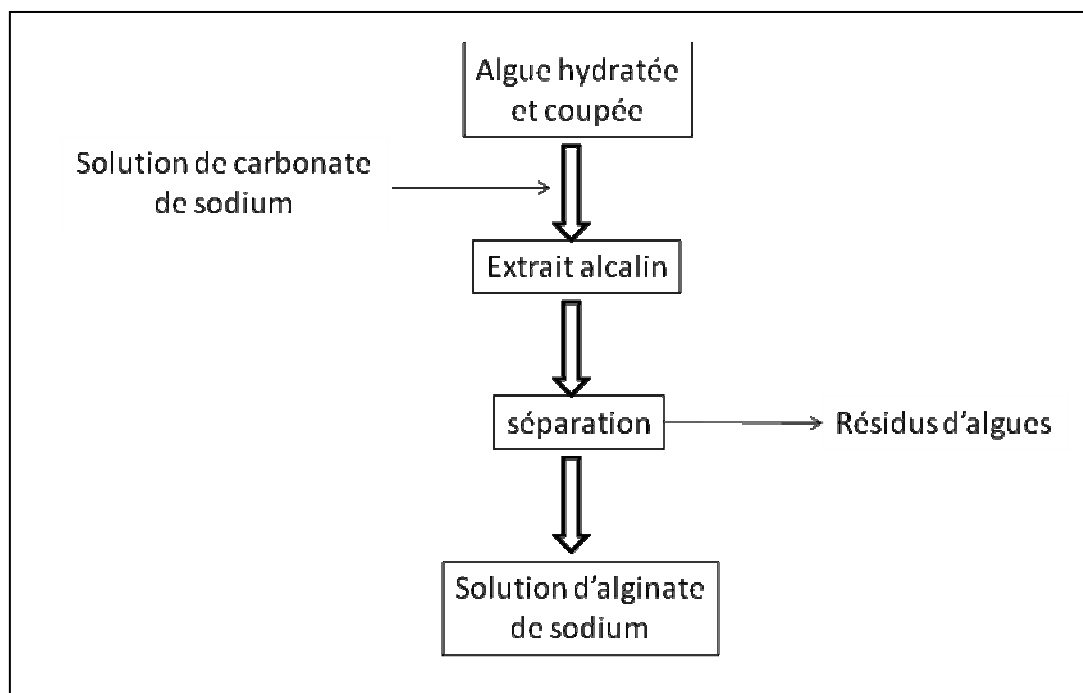


Figure 16 : premières étapes de l'extraction de l'alginate chez les algues brunes : obtention d'une solution d'alginate de sodium

V.1.a. 1^{ère} technique : passage par l'acide alginique (figure 17)

La première technique consiste ensuite à ajouter un acide. On obtient alors de l'acide alginique sous forme de gel, insoluble dans l'eau. Il faut alors extraire le gel de la phase aqueuse. Pour cette dernière extraction, la filtration n'étant pas possible, la flottation est utilisée. La flottation est une technique de séparation basée sur des différences d'affinité pour l'eau des matériaux à séparer. Lors des premières étapes, un excès de solution de carbonate de sodium est utilisé. Ce carbonate est donc toujours présent dans l'extrait et forme à l'ajout de l'acide du dioxyde de carbone gazeux qui s'échappe sous forme de fine bulles. Ces bulles se fixent sur les morceaux d'acide alginique qui remontent alors à la surface où ils peuvent être récupérés en continu.

Le réacteur contient alors une masse d'acide alginique sous forme de gelée qui ne représente que 1 à 2 % d'acide alginique pour 98-99% d'eau. Ce pourcentage doit être réduit. L'utilisation d'une presse à vis est satisfaisante. Certains processus placent le gel dans des paniers dans un cylindre de centrifugation et un filtre. La centrifugation peut amener l'acide alginique à 7-8% et cela est suffisant si l'alcool doit être utilisé dans l'étape suivante. L'acide

est placé dans un mixer et une quantité suffisante d'éthanol ou d'isopropanol est additionnée jusqu'à l'obtention d'un mélange eau-alcool 50-50. A ce moment du carbonate de sodium solide est ajouté graduellement jusqu'à ce que la pâte résultante atteigne le pH désiré. La pâte d'alginate de sodium peut être extrudée sous forme de boulettes séchées au four et pulvérisées.

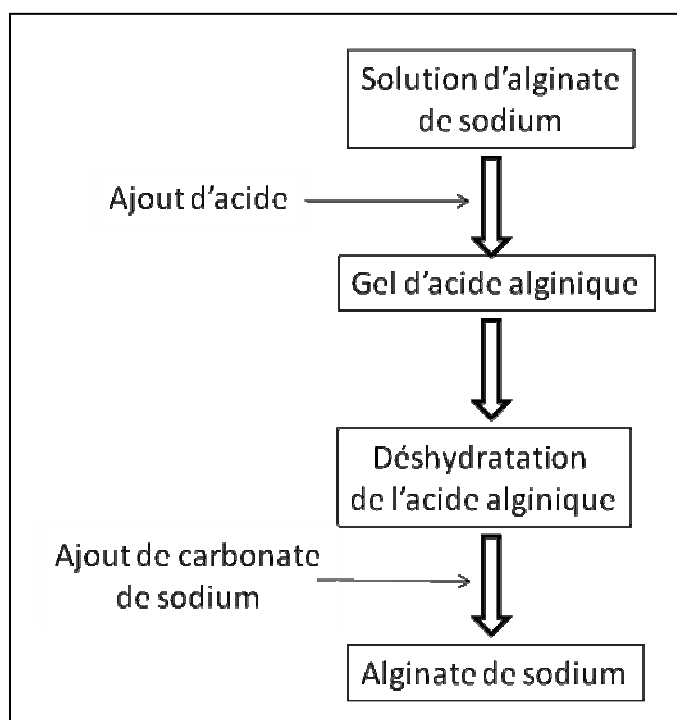


Figure 17 : extraction de l'alginate de sodium à partir de la solution obtenue lors de la première étape : technique de l'acide alginique

V.1.b. 2ème technique : passage par l'alginate de calcium (figure 18)

Quand un sel soluble de calcium tel que du chlorure est ajouté à l'extrait filtré, l'alginate de calcium solide se forme. Si la solution calcique et l'extrait filtré sont mélangés soigneusement, l'alginate de calcium peut être formé sous forme de fibres alors qu'un mauvais mélange donne une masse gélatineuse.

Le matériel fibreux peut être rapidement séparé sur un crible métallique et lavé à l'eau pour enlever l'excès de calcium. Il est ensuite agité en milieu acide dilué, converti en acide alginique qui conserve sa forme de fibres. Cette forme peut être aisément pressée sur un filtre.

Cette compression doit être appliquée très graduellement sinon le résultat attendu ne sera pas atteint. Le produit issu de cette opération est relativement solide et contient seulement 20 à 25 % d'acide alginique. Cependant il est suffisamment sec pour former une pâte quand du carbonate de sodium est mélangé avec lui dans un agitateur adéquat jusqu'à ce que le pH désiré soit atteint, pour le convertir en alginate sodique. La pâte est extrudée en boulettes, séchée au four et pulvérisée.

Le désavantage de cette méthode, comparé à la précédente, est qu'une étape supplémentaire est ajoutée au processus, mais l'avantage est que l'obtention de l'alginate fibreux et de l'acide est plus simple et que l'alcool n'est pas nécessaire. En effet l'alcool est cher et comme il est généralement récupéré et recyclé, et que le recyclage n'atteint jamais 100%, son usage augmente les coûts.

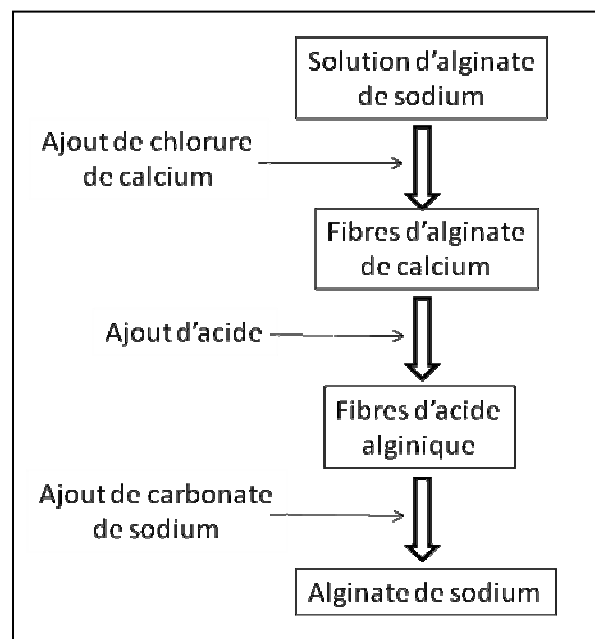


Figure 18 : extraction de l'alginate de sodium à partir de la solution obtenue lors de la première étape : technique de l'alginate de calcium

V.2. autres alginates

L'alginate de sodium est la forme la plus utilisée. De petites quantités d'acide alginique et de sels de calcium, d'ammonium et de potassium et l'ester de propylène-glycol sont aussi produits.

L'alginate de calcium et l'acide alginique sont obtenus durant la préparation de l'alginate sodique ; chacun peut être récupéré au moment approprié et, après lavage, être séché et pulvérisé à la taille voulue.

Les autres sont obtenus par neutralisation de l'acide humide avec la base appropriée, généralement de l'ammoniaque ou du carbonate de potassium, une quantité suffisante d'eau ou d'alcool étant nécessaire pour conserver le produit à consistance souhaitée.

L'alginate de propylène-glycol a des propriétés et des usages différents des autres sels. Il a été breveté pour la première fois en 1947 et a fait l'objet de nombreux autres brevets quant à sa méthode de préparation. Il est obtenu en partant d'acide alginique humide qu'on fait partiellement réagir avec du carbonate de sodium et qui est traité par de l'oxyde de propylène liquide sous pression pendant 2 heures à 80 °C, le produit étant ensuite séché et pulvérisé.

V.3. Autres paramètres importants de la production

Il s'agit de la couleur du produit fini, de l'approvisionnement en eau et de l'élimination des déchets.

V.3.a. Couleur

Si les algues originales sont très colorées, par exemple *Ascophyllum*, l'extrait alcalin sera aussi très coloré et le processus conduira finalement à un produit sombre qui se vend peu cher parce que ses usages sont limités à des applications techniques.

Les algues plus légèrement colorées telles que *Macrocystis*, donnent un produit peu coloré utilisable pour l'alimentation et d'autres applications.

La couleur peut être contrôlée par blanchiment au moyen d'hypochlorite de sodium ajouté à l'extrait alcalin filtré ou même à la pâte à l'étape finale. Néanmoins il convient d'être attentif, car un blanchiment excessif peut abaisser la viscosité de l'alginate, ce qui réduit sa valeur.

Une autre méthode est de tremper les algues dans une solution de formol avant l'extraction alcaline. Le formol aide à fixer les composants colorés à la cellulose des parois cellulaires, si bien que les colorants restent dans les résidus quand l'extrait alcalin est filtré.

V.3.b. Approvisionnement en eau

De grandes quantités d'eau sont nécessaires, spécialement lors de la dilution de l'extrait épais et visqueux en vue d'obtenir une solution de viscosité adaptée à la filtration. Une usine d'alginate ne peut fonctionner qu'avec un abondant et constant approvisionnement en eau.

V.3.c. Elimination des déchets

Les eaux résiduelles de la filtration sont alcalines et contiennent du calcium issu de l'étape de précipitation et de l'acide issu de la conversion acide. Dans certains pays, les eaux sont rejetées à la mer. Quand le respect de l'environnement est plus grand ou quand les ressources en eau sont limitées, le recyclage n'est pas trop difficile et son coût peut être abaissé par la diminution des quantités d'eau nécessaires.

Il convient de trouver le moyen de se débarrasser des résidus solides (algues et résidus de filtration). Ils peuvent être utilisés pour absorber les métaux lourds dans les résidus liquides industriels, et des essais pour produire de l'éthanol par fermentation de la cellulose ont été réalisés, mais ils apparaissent moins intéressants en terme économique.

VI. Les différents emplois de l'alginate

De par ses diverses propriétés colloïdales, c'est-à dire la rétention d'eau, la gélification et la stabilisation des émulsions, les alginates sont employés dans de nombreux domaines.

Ces propriétés sont utilisées dans de nombreuses industries et notamment dans le textile : l'alginate donne la rhéologie souhaitée pour les pâtes et teintures. L'imprimerie les emploie dans les encres pour en améliorer la viscosité mais également dans les livres où ils possèdent des propriétés anti-graisse, augmentent la résistance à l'huile, la prise d'encre et l'imprimabilité.

L'alginate trouve un emploi jusque dans le domaine de la soudure. La fabrication des baguettes à souder y a recours dans l'étape de séchage et de cuisson pour apporter un effet lubrifiant et liant.

L'industrie alimentaire est un gros consommateur d'alginates pour des emplois variés. Les additifs alimentaires sont les suivants : l'acide alginique E400, l'alginate de sodium E401, l'alginate de potassium E402, l'alginate d'ammonium E403, l'alginate de calcium E404 et l'alginate de propylèneglycol E405.

Ils sont retrouvés dans les laits gélifiés en vue de la préparation de desserts lactés, dans les gelées alimentaires pour leurs propriétés gélifiantes. Les glaces et les yaourts contiennent également de l'alginate pour améliorer la texture et la saveur : ces produits deviennent alors plus onctueux.

Dans les crèmes glacées et les sorbets, cet additif empêche la formation de cristaux. Par ailleurs un rôle secondaire dans cet industrie est l'effet stabilisant des alginates. Ce phénomène est notamment trouvé dans les jus de fruits.

Les aliments reconstitués sont également utilisateurs d'alginates pour leur grande capacité de gélification, leur stabilité à la chaleur et leur maniabilité qui permettent de former le produit final facilement (exemples : poissons panés, jambons, cordons bleus). Dans la bière, l'alginate permet de maintenir un taux de mousse suffisant.

Le milieu médical fait aussi partie des consommateurs d'alginate. Des inserts oculaires ont été mis au point à base d'alginate. Ils sont constitués d'un réservoir central chargé en pilocarpine dans une matrice d'acide alginique : ce sont les Ocusert® (figure 19). Ces implants permettent le traitement du glaucome. D'autres applications dans le domaine du remplissage vasculaire utilisent l'alginate comme modificateur de la viscosité des préparations.



Figure 19 : insert oculaire contenant de l'alginate : Ocusert®



Figure 20 : moulage du visage réalisé avec de l'alginate

Les chirurgiens-dentistes se servent de l'alginate pour effectuer des moulages dentaires en vue de la prise d'empreintes. L'avantage de ce produit est qu'il est hypoallergénique.

Cette même propriété est appliquée pour les moulages des parties du corps au cinéma afin créer des effets spéciaux (figure 20).

Les propriétés adoucissantes, filmogènes, hydratantes font des alginate de bons composés pour les produits de beauté. En effet, ils ont la capacité à former des préparations qui s'étalent bien sur la peau et sont agréables au toucher.

La cuisine moderne appelée cuisine moléculaire, s'est inspirée des différentes applications déjà connues des alginate afin de les appliquer dans son domaine. C'est ainsi que les cuisiniers l'utilisent aujourd'hui pour former des billes remplies de différents produits gustatifs (figure 21).



Figure 21 : billes d'alginate contenant un colorant vert ainsi qu'un arôme pour la cuisine moléculaire

Les applications en pharmacie et dans l'ingénierie tissulaire seront détaillées dans les parties suivantes.

PARTIE II :

L'ALGINATE : UN PRINCIPE ACTIF

A/ LES PANSEMENTS CUTANES

I. Les plaies (<http://www.univ-rouen.fr/servlet/com>)

Il existe plusieurs types de plaies : les plaies aiguës et les plaies chroniques. Les plaies aiguës sont des plaies traumatiques qui guérissent souvent spontanément. En revanche les plaies chroniques ne guérissent souvent pas spontanément et nécessitent de long soins.

Les pansements à l'alginate sont principalement utilisés au cours des plaies chroniques afin de traiter des plaies telles que, par exemple, les ulcères de jambe, les escarres,... que nous allons développer.

I.1. L'ulcère de jambe

I.1.a. Définition

Il se définit comme une plaie cutanée chronique, située sous le genou et n'ayant pas de tendance spontanée à la cicatrisation. Si la cicatrisation excède les 6 semaines, il s'agit d'une plaie chronique.

I.1.b. Etiologies

La complication d'une maladie vasculaire constitue plus de 90% des causes d'ulcère de jambe. Cependant d'autres étiologies sont également possibles telles que les vascularites, certaines dermatoses neutrophiliques, certaines infections cutanées profondes (qu'elles soient d'origine bactérienne, parasitaire ou mycosique) ou encore des carcinomes cutanés primitifs ulcérés et certaines hémopathies.

Dans les 90% de causes vasculaires :

- 65% sont d'origine veineuse ;
- 5% d'origine artérielle ;
- 20% d'origine mixte artério-veineuse mais toujours avec une prédominance soit veineuse dans 5% des cas, soit artérielle dans 15% des cas.

I.1.c. Physiopathologie

➤ Ulcère veineux ou à prédominance veineuse.

Il résulte de l'évolution d'une insuffisance veineuse chronique qui elle-même, peut être secondaire aux varices qui entraînent une reflux ou à une insuffisance valvulaire profonde primitive.

Il en résulte une hypertension veineuse responsable d'une altération des cellules endothéliales, d'une augmentation de la perméabilité capillaire ainsi qu'un œdème. Ces troubles de la microcirculation conduisent à une hypoxie tissulaire qui induit l'ulcère (figure 22).



Figure 22 : ulcère veineux au niveau de la jambe.

➤ Ulcère artériel ou à prédominance artérielle

Ils sont souvent la conséquence d'une macroangiopathie oblitérante chronique des membres inférieurs. Les lésions cutanées observées (figure 23) résultent d'une fragilisation de la peau qui est la conséquence directe de l'ischémie par défaut de perfusion artérielle du membre.

Dans cette catégorie, on peut associer l'angiodermite nécrotique qui résulte d'une microangiopathie non inflammatoire associée à une artériosclérose athéromateuse ou qui survient au cours d'un diabète mal équilibré. Cependant ce type d'ulcère est beaucoup plus rare, que les précédents.



Figure 23 : *ulcère de jambe à prédominance artérielle sur le dos du pied*

I.1.d. Aspect clinique

➤ Ulcère veineux ou à prédominance veineuse

Il est caractérisé par une grande taille et des bords irréguliers ou encore décrit en « carte de géographie ». Il est notamment différencié de l'ulcère artériel par sa localisation qui est principalement la région sus-malléolaire interne et la face interne de la jambe. Il peut cependant déborder largement de ces deux zones. De plus, l'ulcère veineux est peu profond et peu douloureux.

Enfin le fond de l'ulcère peut présenter deux aspects différents : propre et bourgeonnant plutôt caractérisé par un bon pronostic alors qu'à l'inverse s'il est recouvert d'un enduit jaunâtre, voire purulent, il est de mauvais pronostic.

En périphérie, on peut observer les signes de l'insuffisance chronique tels que des lésions dermo-épidermiques également appelées « eczéma variqueux » (figure 24), des lésions de capillarite ou dermite ocre et enfin des lésions d'hypodermite.

Associés à ces troubles trophiques, un œdème veineux et des varices peuvent être présents.



Figure 24 : *eczéma variqueux*

➤ Ulcère artériel ou à prédominance artérielle

Il est plus fréquemment situé au niveau des faces antérieure ou latérales de la jambe ou au niveau de la face dorsale du pied et des orteils. De plus l'ulcère artériel est douloureux et profond, avec une douleur exacerbée par le décubitus. Il est caractérisé par une taille plus limitée mais il peut être multiple et surtout à l'emporte-pièce, contrairement à l'ulcère veineux.

La lésion péri-ulcéreuse est froide, décolorée, lisse et dépilée. Enfin des signes de l'insuffisance artérielle peuvent être aperçus, tels que la claudication intermittente ou l'abolition de pouls.

I.1.e. Traitements

➤ Ulcère veineux ou à prédominance veineuse

Le premier traitement est celui de la plaie en elle-même. Il faut la nettoyer et la recouvrir de différents produits tels que des tulles neutres, des plaques d'hydrocolloïdes ou d'hydrocellulaires ou des alginates de calcium qui seront détaillés plus loin.

Il est également important de lutter contre l'œdème en portant une contention élastique mais également en pratiquant une marche quotidienne et en surélevant de 10cm les pieds du lit.

Par ailleurs il est possible d'avoir recours à la chirurgie pour le traitement des varices. Un stripping-crossectomie associé ou non à une phlébectomie est réalisé, mais on peut également avoir recours à une crossectomie en cas de contre indication à l'anesthésie générale. En complément de la chirurgie il est souvent réalisé une sclérothérapie qui peut toutefois être également utilisé en cas de contre-indication à la chirurgie.

Au niveau médicamenteux les veinotoniques ont peu d'intérêt à ce stade.

Enfin il est nécessaire d'associer des mesures hygiéno-diététiques, afin d'éviter le surpoids qui est un facteur de risque important mais l'hygiène locale est également primordiale afin de permettre une cicatrisation la plus rapide possible.

➤ Ulcère artériel ou à prédominance artérielle

Le traitement de la plaie est identique à celui des ulcères veineux, cependant la réalisation est limitée par la douleur. En revanche la contention élastique est contre-indiquée pour l'ulcère artériel car elle favorise l'ischémie.

La chirurgie consiste dans ce cas à réaliser soit un pontage, soit une angioplastie. Il existe un traitement médicamenteux qui est constitué de vasodilatateurs et d'analogues de la prostacycline.

I.1.f. Complications

Les complications sont quasi-identiques pour les deux types d'ulcères : elles sont représentées majoritairement par :

- la surinfection microbienne,
- les lésions ostéo-articulaires,
- l'eczéma de contact,
- l'hémorragie,
- la cancérisation.

Il faut également prendre en compte le retentissement psychologique.

I.2. L'escarre

I.2.a. Définition

L'escarre est une plaie consécutive à une hypoxie tissulaire provoquée par une pression excessive et prolongée (figure 25).

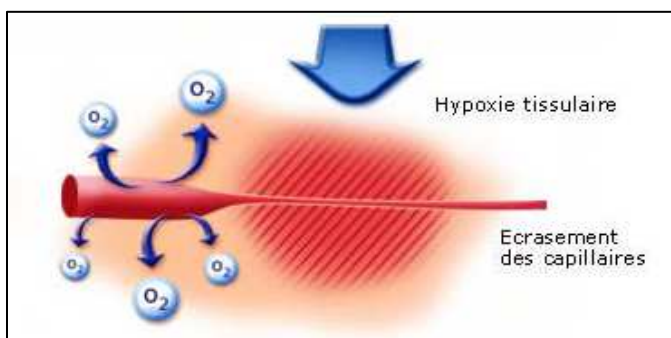


Figure 25 : schéma de l'écrasement des capillaires impliquant une hypoxie tissulaire responsable de la formation de l'escarre. (<http://www.escarre.fr>)

On distingue trois types d'escarres selon les conditions de survenue. L'escarre accidentelle est liée à un trouble temporaire de la mobilité ou de la conscience, dû à une opération chirurgicale, une pathologie aiguë, ... On l'oppose à l'escarre neurologique, liée à une pathologie neurologique avec troubles permanents de la mobilité ou de la sensibilité, et à l'escarre multifactorielle des patients polypathologiques.

I.2.b. Physiopathologie

La pression excessive qui « écrase » les vaisseaux sanguins cutanés et sous-cutanés provoque une hypoxie tissulaire. L'escarre apparaît quand la fermeture des vaisseaux se prolonge. La pression décrite précédemment est spécifique à chacun et dépend également des différentes parties du corps sur laquelle elle s'exerce. On définit des zones à risques telles que le sacrum et les talons qui représentent chacun 40% des escarres. Les autres localisations fréquentes sont les ischions et le trochanter.

Cette hypoxie est favorisée par des vaisseaux sanguins en "mauvais état", notamment à cause d'un diabète, une hypertension, ou un tabagisme ancien, ou simplement du fait de leur vieillissement, ou une faiblesse de la teneur en oxygène du sang (anémie, infection pulmonaire, nicotine, ...).

La faible teneur en oxygène ainsi apportée aux tissus provoque la mort de la peau et des muscles.

La dégradation débute de l'intérieur des tissus pour atteindre ensuite l'extérieur et former une plaie visible. C'est pourquoi sa gravité est souvent importante dès son apparition. De plus l'évolution est très rapide : en quelques heures seulement la plaie peut passer du stade d'érythème au stade d'ulcère par ouverture de la plaie (figure 26).



Figure 26 : Escarre talonnière au stade d'ulcère bourgeonnant

I.2.c. Les facteurs de risques

Ces facteurs de risques sont très importants dans la prise en charge du patient et permettent en partie l'évaluation de la survenue d'une escarre. Ils peuvent être de deux types : extrinsèques et intrinsèques.

Les facteurs extrinsèques sont plutôt de nature mécanique et sont la pression, la friction, le cisaillement (figure 27) et la macération cutanée, alors que les facteurs intrinsèques sont plutôt d'ordre clinique et prennent en compte l'immobilité du patient, les carences nutritionnelles, l'incontinence, l'hypoxie cellulaire, les troubles neurologiques (tels que la paraplégie, les neuropathies périphériques), les troubles psychologiques et enfin l'âge.

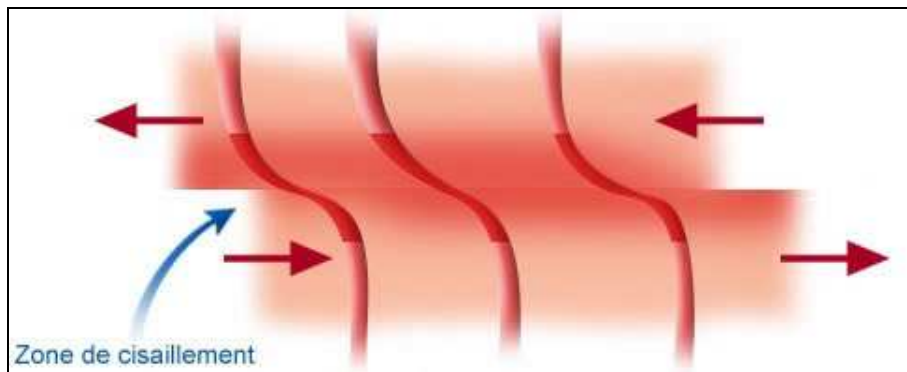


Figure 27 : schéma du cisaillement, facteur de risque de survenue de l'escarre

(<http://www.escarre.fr>)

En plus des facteurs de risque il existe des facteurs de gravité qui compliquent la prise en charge de la plaie et allongent la durée de traitement. Ce sont principalement l'infection, une ostéite associée, et un décollement périphérique et fistulaire.

I.2.d. Classification

Il existe deux classifications : anatomiques et colorielle. Les classifications anatomiques sont au nombre de huit et sont réparties en trois groupes différents : les anatomiques proprement dites, les anatomo-cliniques et les cliniques. Ces dernières sont assez compliquées. C'est pourquoi la classification colorielle, beaucoup plus simple d'emploi, est fréquemment utilisée. Elle se base sur la couleur de la plaie : rouge pour le bourgeonnement, jaune pour l'exsudat ou la fibrine, noir pour la nécrose.

La classification la plus utilisée reste tout de même la NPUAP (National Pressure Ulcer Advisory Panel) qui détermine quatre stades de l'escarre.

II. La cicatrisation (Hienne, 2008)

II.1. Définition

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes dynamiques physiologiques aboutissant à la réparation d'une plaie. Elle est très variable d'une plaie à une autre et sa durée est dépendante de nombreux facteurs mais en particulier du type de plaie. On en distingue deux catégories : les plaies dites aiguës causées par un agent traumatique et les plaies chroniques qui ne cicatrisent pas spontanément. Ces dernières sont entre autres constituées par les plaies décrites ci-dessus.

II.2. Physiologie de la cicatrisation

La cicatrisation apparaît à la suite d'une plaie. Elle permet de réparer les tissus lésés. Cette cicatrisation se déroule en quatre étapes :

- la phase de détersion encore appelée exsudation. Elle est caractérisée par une action de nettoyage. La cicatrisation débute toujours par l'apparition de signes inflammatoires précoces : rougeur, chaleur, douleur, œdème. A la suite de cette première étape une vasoconstriction des extrémités va permettre de stimuler la coagulation via l'activation de la thrombokinasé. Après plusieurs minutes, un exsudat va se former. Ce liquide va permettre la défense contre les infections mais également la détersion de la plaie. L'augmentation de la perméabilité capillaire va favoriser le passage du plasma, des leucocytes, des macrophages et des anticorps qui vont avoir une action de phagocytose et de protéolyse qui prépare la plaie à la phase suivante. Cette phase dure entre deux et six jours. Parallèlement, alors que la détersion se poursuit, il y a une augmentation du nombre des mitoses au niveau de la plaie et les fibroblastes commencent à se multiplier sous l'influence des macrophages.

- La phase de réparation tissulaire encore appelée phase de granulation. Cette phase va permettre la cicatrisation dermique par comblement de la perte de substance par un tissu néoformé. La prolifération des fibroblastes évoqués ci-dessus se poursuit. Ces cellules vont permettre la production de mucopolysaccharides qui serviront de matrice aux fibres de collagène afin d'obtenir la construction d'un réseau de collagène et d'élastine. Le collagène va être synthétisé à partir du pro-collagène. Les fibres isolées ainsi obtenues vont former les

fibres définitives insolubles sous l'action de la vitamine C, de l'oxygène et du fer. Ce réseau de fibre va ensuite être intégré à la matrice.

Parallèlement des néo-capillaires vont se former, assurant ainsi la nutrition du tissu (figure 28). Ils se forment jusque sur la surface de la lésion provoquant une couleur rouge vif de la plaie.



Figure 28 : plaie en phase de granulation présentant un aspect rouge vif en raison de la formation de néo-capillaires assurant la nutrition du tissu.

A la surface de la plaie va se former une couche de sécrétion fibrineuse dans laquelle vont venir s'inclure des bourgeons vasculaires et des cellules conjonctives. Cette nouvelle couche va produire à son tour une deuxième couche et ainsi de suite. On observe un bourgeonnement progressif qui tend à combler la perte de substance. Pour cette raison, il arrive que cette phase soit également nommée phase de bourgeonnement ; elle débute entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour et peut durer jusqu'à trois semaines.

- La phase d'épidermisation (figure 29) encore appelée phase d'épithélialisation ou de maturation. Cette phase débute par la transformation des fibroblastes en myofibroblastes



Figure 29 : plaie en phase d'épidermisation

doués d'une capacité de contraction. Cette propriété va permettre aux kératinocytes voisins de migrer du bord de la plaie vers le centre. Une fois la plaie recouverte entièrement la migration va être stoppée et une nouvelle phase de différenciation cellulaire va débuter afin de reconstituer un épithélium pluristratifié. Parallèlement les kératinocytes vont reconstruire une membrane basale qui va permettre de solidariser le derme et l'épiderme.

Cette phase peut durer plusieurs mois mais est raccourcie à quelques jours quand la plaie est suturée.

- La phase de consolidation encore appelée phase de remodelage. Lors de la phase précédente la plaie se referme et est constituée d'un tissu cicatriciel qui ne possède pas les mêmes propriétés que le tissu d'origine. Afin de s'approcher au plus près de la structure originelle du tissu, la cicatrice évolue progressivement par remodelage constant. Ce remodelage peut prendre plusieurs mois.

II.3. La cicatrisation dirigée

Elle consiste à orienter la cicatrisation vers une guérison la plus rapide possible. C'est la méthode la plus simple pour traiter une perte de substance superficielle. Il s'agit d'une technique simple et peu coûteuse faisant appel uniquement à des pansements répétés, le but étant d'obtenir le bourgeon de granulation décrit ci-dessus le plus rapidement possible.

Pour le traitement de l'escarre par exemple on utilise la technique de la cicatrisation dirigée en milieu humide. Cette technique repose sur deux principes fondamentaux : maintenir un environnement chaud et humide et un exsudat au contact de la plaie. L'exsudat ainsi maintenu va permettre la détersion de la plaie grâce à la présence de leucocytes mais va également permettre la reconstruction tissulaire grâce aux facteurs de croissance présents dans ce même liquide. Le maintien en milieu chaud et humide permet quant à lui d'accélérer les phénomènes tout en conservant la flore naturelle de la plaie qui permet une bonne cicatrisation. De plus cette flore est cyclique et alterne bactérie gram + et gram -. Il est donc nécessaire de maintenir ces cycles, d'où la nécessité de ne pas utiliser d'antibiotiques locaux pour le traitement des escarres par exemple.

III. Les pansements

III.1. Le pansement "idéal"

Il existe deux pansements : le primaire et le secondaire. Le primaire est celui qui va être au contact de la plaie et qui par conséquent doit posséder les propriétés adéquates aux

différents types de plaies. Le secondaire va recouvrir le primaire si ce dernier n'est pas adhésif.

Le pansement idéal n'existe pas. Cependant le cahier des charges théorique de ce dernier est le suivant, il doit :

- maintenir la plaie en milieu humide et chaud,
- être modifié selon les stades de cicatrisation,
- être perméable aux échanges gazeux mais non aux bactéries,
- absorber l'excès d'exsudat produit par la plaie,
- ne pas coller à la plaie mais adhérer à la peau saine sans se décoller ou s'abîmer rapidement, le tout en étant facilement applicable et confortable,
- ne pas être toxique et être hypoallergénique,
- protéger des chocs,
- être transparent afin de pouvoir visualiser la plaie sans retirer le pansement,
- être le moins coûteux possible et réduire le temps de traitement.

III.2. Les différents types de pansements

- Les Hydrocolloïdes. Ce sont comme leur nom l'indique des pansements contenant des particules d'hydrocolloïde c'est-à-dire formant un gel au contact d'eau. Grâce à cette propriété de gélification ils contrôlent la production d'exsudat. Ils possèdent de nombreuses autres qualités du « pansement idéal » décrit ci-dessus. Pour cette raison ils peuvent être utilisés à tous les stades de la cicatrisation. Cependant leur utilisation est plus fortement conseillée pour les plaies peu ou modérément exsudatives. On peut par conséquent les utiliser dans les escarres, les ulcères de jambes,...

- Les Hydrocellulaires. Comme les précédents, ils sont destinés à la cicatrisation en milieu humide mais en étant pour leur part totalement synthétiques. La construction de ces pansements en trois couches leur permet d'absorber les exsudats tout en conservant une certaine humidité et en protégeant des bactéries. Pour ces raisons ils sont plus utilisés dans le traitement des plaies exsudatives et particulièrement des escarres ou des ulcères.

- Les Hydrofibres. Ces pansements peuvent absorber jusqu'à 30 fois leur poids de liquide qu'ils retiennent ce liquide par gélification. Ce fort pouvoir absorbant indique leur utilisation à tous les stades de la cicatrisation pour des plaies très exsudatives. Un des avantages de ces pansement est leur utilisation sur des plaies infectées.
- Les Hydrogels. A la différence des précédents, les hydrogels n'absorbent pas mais relarguent progressivement de l'eau sur la plaie afin de la réhydrater, permettant une bonne détersion. Ces pansements sont donc indiqués dans la détersion des plaies sèches.
- Les irrigo-absorbants. Ils irriguent la plaie en relarguant progressivement une solution de Ringer qui permet le ramollissement des tissus à déterger. D'autres part ils absorbent les exsudats. Par cette double propriété, ils favorisent la détersion et la formation du tissu de granulation.
- Les alginates (figure 30). Ils seront détaillés plus loin.



Figure 30 : compresse d'alginate et pansement Algostéril®

- Les pansements au charbon. L'adjonction de charbon activé dans les pansements leur confère une propriété d'adsorption des bactéries et des odeurs. Pour une activité bactéricide plus importante il est parfois associé au charbon des sels d'argent. En raison de cette propriété, ces pansements sont utilisés pendant la phase de détersion sur des plaies infectées et nauséabondes.
- Les pansements à base d'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est un élément naturel de la peau qui a un fort pouvoir hygroscopique, régule les phénomènes inflammatoires, stimule l'angiogenèse et la prolifération cellulaire et protège contre les infections. Or dans une plaie, l'acide hyaluronique est absent. Ces pansements permettent donc un apport exogène de cet acide afin d'améliorer la cicatrisation. Pour ces raisons, ils sont utilisables pour de

nombreuses plaies, mais dans la pratique on les préfère pour la prise en charge des plaies bourgeonnantes.

- Les pansements à l'argent. Comme indiqué pour les pansements au charbon, l'argent est un puissant antibactérien à large spectre. Pour augmenter son efficacité il est parfois associé à une autre substance bactériostatique, un sulfamide. Cette association permet donc de traiter des plaies infectées ou à risque.

- Les films. Ils sont constitués de polyuréthane semi-perméable. Par conséquent ces pansements sont souples, transparents et ne collent pas à la plaie mais aux bords sains. Ces films sont imperméables à l'eau et aux bactéries et retiennent donc l'exsudat afin de maintenir la plaie dans un milieu humide favorable. Cependant ils restent perméable aux gaz. Ces pansements sont donc principalement utilisés pour les plaies sèches en phase d'épidermisation mais également en prévention des escarres aux endroits à risque. On les retrouve également en pansement secondaire.

- Les tulles. Ce sont des pansements imprégnés d'une substance grasse non adhérente (de type vaseline, paraffine,...) qui permet le maintien d'un taux d'humidité qui reste néanmoins faible. En effet les corps gras laissent passer très lentement l'exsudat. Les tulles sont donc principalement utilisés pour la phase de bourgeonnement des plaies sèches.

- Les interfaces. Leur composition est variée (polyester, acétate de cellulose imprégnée d'une émulsion ;...). Elles ne collent pas à la peau et ne sont pas grasses malgré leur aspect mais maintiennent un milieu humide au niveau de la plaie. Les interfaces sont donc employés pour le traitement de la phase de bourgeonnement ou d'épidermisation des plaies peu exsudatives.

- La matrice à effet antiprotéase. Elle renferme du collagène et de la cellulose. Ces deux composés interviennent en régulant l'environnement de la plaie. Au contact de l'exsudat, la matrice se gélifie en inhibant les protéases qui dégradent la matrice extracellulaire nécessaire à la régénération du nouveau tissu et en relarguant des facteurs de croissance favorables au bourgeonnement de la plaie. Ces pansements sont donc utilisés pour les plaies dont on souhaite accélérer la cicatrisation sous réserve que la plaie ne présente pas de tissu nécrotique.

III.3. Le choix du pansement

Deux critères sont majeurs dans le choix d'un pansement : le stade de la cicatrisation et l'importance des exsudats.

Les critères mineurs sont quant à eux l'état de la peau en périphérie de la plaie, la localisation de la plaie, sa profondeur, la douleur, les odeurs,...

Le stade de cicatrisation est défini par le personnel soignant à l'aide d'une classification colorimétrique basée sur la même méthode que celle utilisée pour les escarres. Ce code couleur est international et défini comme :

- Noir les tissus de nécrose,
- Jaune les tissus fibrineux et
- Rouge les tissus de granulation.

Afin de ne pas confondre le rouge de la granulation et de l'épidermisation, et le jaune des tissus de nécrose et d'une plaie purulente, les équipes soignantes ajoutent respectivement les couleurs rose et vert.

Une couleur dominante est ainsi observée et le traitement peut alors être adapté au stade de la cicatrisation.

La cicatrisation en milieu humide est une technique aujourd'hui largement approuvée. Il est donc nécessaire d'adapter le pansement afin de réguler l'exsudat produit. Pour une plaie très exsudative, il sera nécessaire d'absorber une partie de ce liquide, en revanche pour une plaie sèche, il sera nécessaire de maintenir l'exsudat produit. Il faut maintenir un taux d'humidité idéal et constant.

En conséquence pour chaque type de plaies il existe une indication de pansements comme l'indique le tableau 3.

Tableau 3 : tableau décisionnel pour le choix du pansement en fonction de l'échelle colorielle de la plaie et de l'importance de l'exsudat

Couleur prédominante	Importance de l'exsudat	Traitement
Plaie noire	Sec ou peu important	Détersion mécanique, hydrogel, irrigo-absorbant
	Modéré ou important	Détersion mécanique, alginate, hydrofibre, pansement au charbon ou à l'argent
Plaie jaune	Sec, atone ou peu important	Détersion mécanique, hydrogel, irrigo-absorbant
	Modéré à important	Détersion mécanique, alginate, hydrofibre, hydrocolloïde
	Malodorant, colonisation critique, exsudat important	Détersion mécanique, alginate, charbon, pansement à l'argent
Plaie rouge	Sec ou peu important	Hydrogel, tulle, interface, hydrocellulaire ou hydrocolloïde
	Modéré à important	Hydrocellulaire
	Hémorragique	Alginate
	Hyperbourgeonnement	Dermocorticoïde

IV. Les pansements à l'alginate (<http://brothier.com/>)

IV.1. Composition et formes

Le principe actif de ces pansements est l'alginate de calcium. Il peut être seul comme pour les compresses Algostéril® (Brothier), Sorbalgon® (Hartmann) ou Melgisorb® (Mölnlycke), ou bien associé avec un deuxième principe actif : le carboxyméthylcellulose (CMC), un hydrocolloïde à fort pouvoir absorbant. Cette association est notamment retrouvée dans les compresses Urgosorb® (Urgo), Askinasorb® (B. Braun Médical) et Seasorb soft® (Coloplast) (tableau 4).

Ces pansements sont disponibles sous deux formes : des compresses allant d'une taille de 5 x 5 cm à 10 x 20 cm et des mèches allant de 2 x 32 cm à 3 x 44 cm. Les compresses sont plus utilisées pour des plaies assez étendues et peu profondes, alors que les mèches sont plus appropriées à des petites plaies profondes (Vidal, 2010).

Tableau 4 : différents pansements à base d'alginate remboursés par la sécurité sociale

CODE	RÉFÉRENCE	TARIF (en euros TTC)	Prix limite de vente au public (en euros TTC)
1330840	Pansement d'alginate de calcium pur, BROTHIER, ALGOSTERIL, < 100 cm ²	0,84	0,84
1365465	Pansement d'alginate de calcium pur, BROTHIER, ALGOSTERIL, < 100 cm ² , boîte de 10	8,40	8,40
1345037	Pansement d'alginate de calcium pur, BROTHIER, ALGOSTERIL, ≥ 100 cm ² et < 200 cm ²	3,35	3,35
1394521	Pansement d'alginate de calcium pur, BROTHIER, ALGOSTERIL, ≥ 100 cm ² et < 200 cm ² , boîte de 16	53,60	53,60
1316120	Pansement d'alginate de calcium pur, BROTHIER, ALGOSTERIL, ≥ 200 cm ²	6,71	6,71
1371253	Pansement d'alginate de calcium pur, BROTHIER, ALGOSTERIL, ≥ 200 cm ² , boîte de 16 compresses ou mèches	107,36	107,36

IV.2. Propriétés

Au contact de la lésion, l'alginate échange ses ions Ca⁺ avec les ions Na⁺ des liquides biologiques, activant ainsi les cellules impliquées dans la cicatrisation. De plus les fibres d'alginate se gélifient, créant un environnement humide favorable au processus cicatriciel. Il possède donc un fort pouvoir d'absorption, supérieur à celui des hydrocolloïdes et des hydrocellulaires. L'alginate possède donc une propriété cicatrisante.

Par ailleurs, cette substance naturelle a l'avantage de posséder une propriété d'hémostase. Son efficacité résulte d'une activation locale de la coagulation par les ions calcium. Les fibres d'alginate constituent également une matrice permettant de structurer et de renforcer le réseau du caillot sanguin.

L'alginate diminue le risque infectieux au niveau local en fixant les bactéries de la lésion sur son réseau de fibres gélifiées. Enfin, l'alginate n'induit pas la prolifération des germes responsables du syndrome de choc toxique.

IV.3. Indications

De par leur pouvoir absorbant, ces pansements vont pouvoir être utilisés pour des plaies très exsudatives comme les ulcères de jambes, les escarres, les plaies traumatiques, ... De plus ils sont davantage utilisés dans les plaies aux stades de détersion.

Ce pouvoir absorbant peut, à l'inverse, être utilisé pour des plaies sèches. En effet, si le pansement est hydraté à l'aide de chlorure de sodium 0,9% avant l'application, celui-ci va permettre de maintenir un certain taux d'humidité au niveau de la plaie.

Il a été vu ci-dessus que l'alginate possédait des propriétés hémostatique et anti-infectieuses. Il est donc possible d'utiliser ces compresses sur des plaies hémorragiques et infectées.

IV.4. Mode d'utilisation

La plaie est nettoyée à l'aide d'une solution de sérum physiologique puis séchée.

Le pansement à l'alginate est ensuite appliqué sur la plaie. Il est nécessaire de choisir une compresse de taille suffisante afin de la recouvrir entièrement et en prenant en compte la rétraction de la compresse lors de l'absorption de l'exsudat. Les compresses peuvent être utilisées sèches lorsque la production d'exsudat est importante ou humidifiées avec du chlorure de calcium 0,9% lorsque la plaie est peu exsudative. Le tout est ensuite recouvert d'un pansement secondaire, à l'exception des plaies infectées où l'enfermement de la plaie est contre-indiqué.

Afin de le retirer plus facilement il est possible d'humidifier le pansement.

Le renouvellement du pansement est variable, il dépend de trois facteurs : la quantité d'exsudat produit, la présence d'une infection, et la propreté de la plaie. Pour une plaie très exsudative le pansement sera renouvelé tous les jours comme pour une plaie infectée ou recouverte de débris fibrino-nécrotiques. En revanche pour les plaies moins exsudatives, non infectées et propres (sans débris), le renouvellement peut se faire tous les deux jours seulement.

IV.5. Contre-indication, précaution d'emploi

En raison de leur fort pouvoir absorbant, il est déconseillé de les appliquer sur des plaies sèches, nécrosées ou sur des brûlures. Dans le cas des plaies sèches, une alternative consiste à les humidifier avec du chlorure de sodium 0,9%.

Si la plaie présente des signes de surinfection, le pansement primaire d'alginate ne doit pas être recouvert par un pansement secondaire occlusif qui favoriserait la prolifération bactérienne.

Lors du retrait des mèches notamment, il arrive que des fibres restent dans la plaie, pouvant alors provoquer un état inflammatoire ou infectieux au niveau de la plaie. Il est donc nécessaire d'être vigilant lors du retrait et de vérifier l'absence de fibres dans la plaie.

Enfin il existe une interaction avec la chlorhexidine et les produits alcalins. Ces derniers entraînent la solubilisation du pansement. Par conséquent si la plaie a été en contact avec ces produits, il faut la rincer abondamment à l'aide d'une solution physiologique avant d'appliquer le pansement.

B/ LES PANSEMENTS HEMOSTATIQUES

Après un brève présentation de l'hémostase, nous envisagerons les pathologies et les traitements.

I. Physiologie de l'hémostase

Toute lésion de la paroi endothéliale entraîne l'activation des processus hémostatiques qui conduisent à la formation du thrombus. Trois étapes interviennent dans ce phénomène :

- L'hémostase primaire qui fait intervenir les plaquettes –qui nous seront détaillées plus loin- et conduit à la formation du thrombus blanc,
- La coagulation qui génère la fibrine,
- La fibrinolyse qui limite l'extension du thrombus et permet sa résorption.

Nous allons nous intéresser, dans les paragraphes suivants, uniquement à l'hémostase primaire, lieu d'action des pansements hémostatiques.(Tortora, 2001)

I.1. Le système plaquettaire

Les plaquettes également appelées thrombocytes sont des éléments figurés du sang, discoïdes et anucléés. Elles sont issues de l'éclatement des mégacaryocytes et sont donc constituées de cytoplasme, de granulations et d'une membrane phospholipidique. Cette dernière contient des glycoprotéines de type GP Ib-IX, GP IIb-IIIa.

Les plaquettes sont activées (figure 31) par différentes protéines telles que les prostaglandines, le facteur 3 plaquettaire (F3P) ou le platelet activating factor (PAF). Cette activation joue un rôle majeur dans le processus d'hémostase primaire mais peut à l'inverse devenir délétère lorsque ces éléments s'auto-activent en situation d'agression longue et répétée comme notamment dans le cadre de la pose de valve cardiaque.

Les thrombocytes sont donc en équilibre entre trois états permettant ainsi l'hémostase primaire que nous expliquerons dans le paragraphe suivant :

- En circulation libre,
- En adhésion à la surface endothéliale lésée,
- Agrégé.

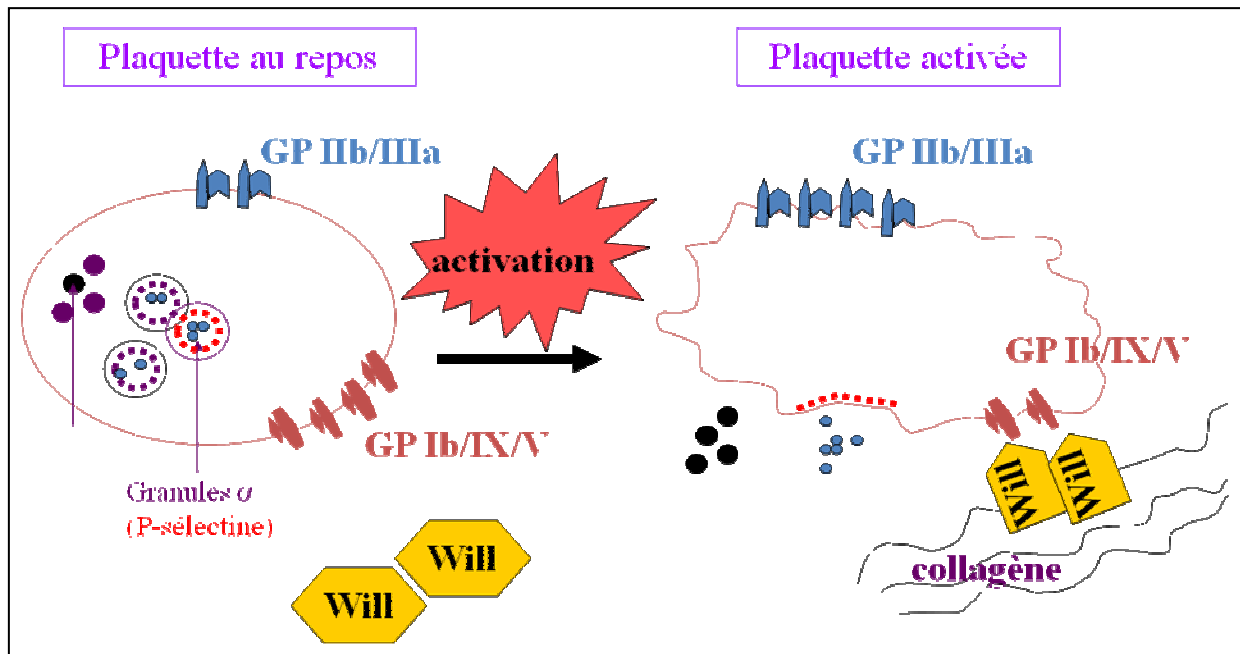


Figure 31 : structure d'un thrombocyte au repos et son activation à la suite d'une brèche vasculaire.

I.2. Le rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire (figure 32)

I.2.a. L'adhésion plaquettaire

Cette étape est une modification des propriétés physiques de la membrane plaquettaire pour faciliter sa fixation sur l'endothélium. Ce phénomène fait intervenir plusieurs facteurs dont :

- Le facteur von Willebrand (vWF), sécrété principalement par l'endothélium mais également par les granules plaquettaires,
- Le fibrinogène,
- La β -thromboglobuline (β -TG),
- Le calcium.

La lésion de l'endothélium entraîne la mise en contact du sang avec les fibres de collagène et la couche sous endothéliale qui est fortement thrombogène.

Le vWF sécrété va alors se fixer aux fibres de collagène de la matrice sous-endothéliale. Cette fixation va entraîner une modification de la conformation de ce facteur qui va alors pouvoir adhérer aux plaquettes via les glycoprotéines GP Ib-IX.

Les plaquettes adhèrent donc à la lésion via le facteur von Willebrand et démarrent ainsi l'arrêt du saignement *in situ*. Cette adhésion va permettre l'activation des plaquettes, étapes suivantes de l'hémostase.

I.2.b. L'activation plaquettaire

L'activation est caractérisée par un changement de morphologie des plaquettes. Elles changent tout d'abord de forme et deviennent sphériques avec la formation de pseudopodes qui témoignent de la réorganisation des protéines contractiles.

De plus on peut observer un regroupement de granules qui va permettre une sécrétion rapide des substances biologiquement actives. Enfin au cours de la sécrétion on note une augmentation significative du nombre des glycoprotéines GP IIb-IIIa impliquées dans l'hémostase.

Cette activation a pour but de préparer les plaquettes à l'agrégation.

I.2.c. L'agrégation plaquettaire

Il s'agit de la faculté des plaquettes à s'agréger entre elles sous l'effet d'un stimulus. Ce processus est induit par différents facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques dépendent du métabolisme intra-plaquettaire : on peut citer pour exemple la concentration en calcium ionisé. Quant aux facteurs extrinsèques, ils peuvent être soit biologiques (concentration de protéines par exemple), soit mécaniques.

Ces facteurs agissent en favorisant la liaison entre les GP IIb-IIIa, le vWF et le fibrinogène. Cependant cette liaison n'est possible qu'en présence de calcium. Il en découle alors une agrégation plaquettaire qui est l'étape principale de l'hémostase primaire (Lévy-Toledano, 1995, Szefner, 2008, Gaussem, 2007).

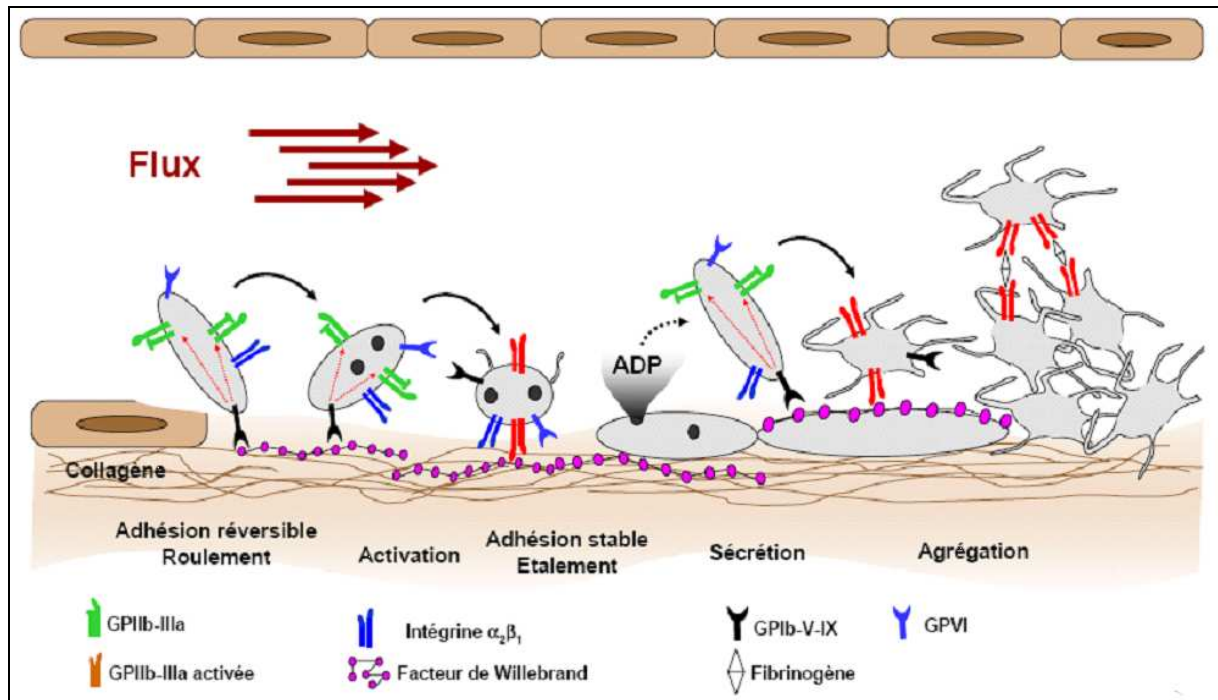


Figure 32 : l'h mostas  : aspects moléculaires de l'adhésion, de l'activation et de l'agrégation plaquettaire

II. La pathologie : l'épistaxis

L'épistaxis est une pathologie lorsqu'elle est bénigne, qui fait intervenir l'h mostas  primaire et dont le traitement principal repose sur l'utilisation de pansements hémostatiques (<http://saignementdenez.com>).

II.1. Définition

L'épistaxis encore appelé saignement de nez est un écoulement de sang extériorisé par le nez. Il s'agit d'un symptôme et non une maladie et il survient de manière inattendue. Dans la majorité des cas, il s'agit d'un  v nement sans gravité qui peut être résolu par le patient lui-même. Dans certains cas (persistance, abondance et/ou répétition du saignement), l'épistaxis nécessite une prise en charge adaptée par un médecin.

II.2. Physiopathologie

La localisation du saignement de nez est la muqueuse nasale. Cette dernière est fragile et richement vascularisée, notamment au niveau de la tache vasculaire (figure 33) située de chaque côté de la cloison nasale à environ 1cm de l'entrée du nez. Toute agression de la muqueuse entraîne un risque de rupture des vaisseaux sanguins et donc un saignement de nez.

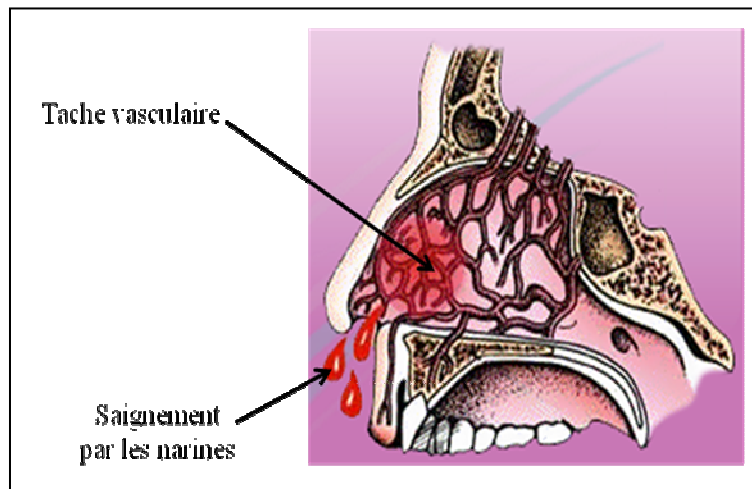


Figure 33 : fosses nasales présentant une tache vasculaire conduisant à un épistaxis

II.3. Etiologies

Pour les épistaxis sans gravité, les causes peuvent être multiples. Cependant, pour les épistaxis plus graves, il existe souvent une pathologie sous-jacente à explorer.

Les causes multiples évoquées ci-dessus sont :

- Les traumatismes tels qu'une fracture du nez,
- Le grattage,
- Le mouchage énergique,
- L'altitude,
- La chaleur,
- La sécheresse,
- Les anomalies vasculaires,
- ...

II.4. Traitements

Si la cause des saignements est une pathologie sous-jacente, il est nécessaire de la traiter pathologie avant de traiter l'épistaxis en lui-même.

Cependant, le traitement de l'épistaxis repose sur trois types approches :

- Le traitement anti-agrégant plaquettaire médicamenteux,
- La compression médicale,
- Les pansements hémostatiques à base de mèches.

Ces traitements sont développés dans la partie suivante.

III. Les médicaments hémostatiques

III.1. généralités

Il existe deux grands types de médicaments hémostatiques :

- Les médicaments utilisés par voie systémique,
- Les médicaments utilisés par voie topique.

Les médicaments administrés par voie générale sont des antiplaquettaires utilisés lors d'hémorragies. Cinq classes (que nous ne détaillerons pas) les composent (Lecompte, 1995) :

- Les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (COX) plaquettaire. Ils ont représentés par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) dont l'aspirine et le flurbiprofène sont les plus utilisés.
- Les inducteurs de l'augmentation de l'AMP cyclique intraplaquettaire. Deux molécules sont actuellement commercialisées en France : le dipyridamole et l'iloprost.
- Les antagonistes des récepteurs à l'ADP ou thiéno-pyridines sont la ticlopidine et le clopidogrel.
- Les antagonistes des récepteurs GP IIb-IIIa dont les molécules aujourd'hui employées sont l'abciximab, l'eptifibatide et le tirofiban.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux médicaments par voie topique ou hémostatiques locaux.

III.2. Les hémostatiques locaux

Ces produits sont utilisés en vue d'accélérer l'hémostase au niveau des plaies et des téguments. Ils sont notamment utilisés pour traiter les petites hémorragies simples lorsque la compression n'est pas possible ou pas suffisante.

Il en existe deux types :

- Les non-absorbables qui sont : l'adrénaline, l'eau oxygénée, certains sels de fer, des préparations dérivées du sang avec thrombine, fibrinogène ou fibrine et l'hémocoagulase.
- Les absorbables : ce sont la gélatine, la cellulose oxydée régénérée, le collagène microfibrillaire hémostatique et l'alginate de calcium.

Ce sont ces derniers que nous allons développer.

IV. Les hémostatiques locaux à base d'alginate

IV.1. Mécanisme d'action

Comme nous l'avons vu précédemment dans la physiologie de l'hémostase, le calcium est un élément indispensable pour l'agrégation plaquettaire. Il permet l'initiation du phénomène d'hémostase et nécessite d'être présent à une concentration suffisante pour l'agrégation plaquettaire. Ainsi les hémostatiques permettent d'induire une concentration de calcium suffisant au niveau de la plaie en échangeant les ions calcium présents dans les fibres de l'hémostatique avec les ions sodium présents dans le sang.

Cet échange va permettre par ailleurs de former un gel hydrophile. Les fibres d'alginate ainsi gélifiées vont rester emprisonnées dans la blessure et dans la croûte qui va se former. Ces dernières vont être éliminées avec la croûte.

Ces produits induisent l'agrégation plaquettaire, permettant ainsi de raccourcir le temps de formation du caillot sanguin et le temps de coagulation. Les fibres d'alginate constituent également une matrice qui permet de renforcer le caillot et donc d'améliorer l'arrêt du saignement.

IV.2. Composition et formes

Ces pansements sont composés de fibres d'alginate pur. Les pansements hémostatiques sont commercialisés sous deux formes : compresses (figure 30) et mèches (figure 34). Les compresses sont utilisées pour les grandes plaies alors que les mèches sont utilisées pour les petites hémorragies et les petites plaies profondes. Il existe une forme poudre mais son utilisation est beaucoup moins fréquente. (<http://brothier.com/>)



Figure 34 : mèche d'alginate (Coalgan®)

IV.3. Indications

L'indication principale est l'hémostase lors de procédures chirurgicales lorsque la compression, la ligature ou les autres procédés sont inefficaces ou impraticables.

Les différents hémostatiques locaux à base d'alginate commercialisés en France sont :

- Stop-Hémo® : Stop-Hemo est disponible sous 3 formes adaptées aux différents types de plaies :
 - o Stop-Hemo poudre pour les éraflures, les zones de plis, les érythèmes fessiers, les plaies du cuir chevelu, les coupures de rasoir, les varicelles suintantes ;
 - o Stop-Hemo pansements pour les coupures, les ampoules ouvertes, les petites plaies ;
 - o Stop-Hemo compresses pour les brûlures superficielles et suintantes, les saignements de nez, les plaies avec saignements.

- Coalgan® : est utilisés dans les saignements cutanés et muqueux (nez, points de ponction, extraction dentaire, coupure,...).

IV.4. Interactions- précautions d'emploi

Ces produits sont très bien tolérés et possèdent peu d'effets indésirables et d'interactions. Seule leur utilisation en association avec des solutions alcalines est contre-indiquée car il en résulte des incompatibilités physico-chimiques comme nous le verrons avec les pansements.

Ils ne doivent pas être laissés en place plus de 24 heures.

C/ LES PANSEMENTS GASTRIQUES

I. Système digestif

I.1. Physiologie de la sécrétion gastrique.

La muqueuse gastrique est constituée de plusieurs types glandulaires (figure 35) :

- Des glandes cardiales très peu nombreuses et dont le rôle est quasiment identique à celui des glandes pyloriques ;

- Des glandes fundiques qui ont une fonction principale sécrétrice des sucs gastriques.

Ce sont des glandes tubuleuses droites constituées par :

- * Les cellules du collet contenant des grains à mucigène et par conséquent produisant le mucus.

- * Les cellules principales sécrétrices des enzymes digestives dont principalement le pepsinogène précurseur de la pepsine.

- * Les cellules bordantes, également appelé pariétales, sécrétrices d'acide chlorhydrique et de facteur intrinsèque.

- * les cellules argentaffines, beaucoup moins nombreuses que les précédentes et appartenant au système neuro-endocrine diffus.

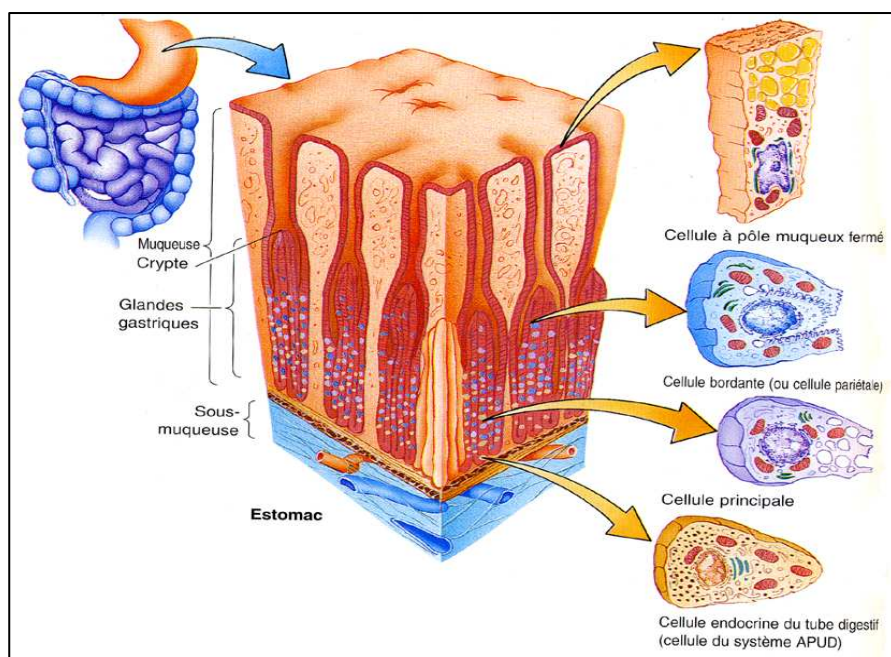


Figure 35 : coupe de la muqueuse stomachale et détail des différentes cellules qui la composent.

- Des glandes pyloriques, glandes tubuleuses contournées de type muqueux constituées par des cellules muqueuses qui produisent une sécrétion mucoïde et par quelques cellules argentaffines à gastrine. Elles sécrètent le mucus qui protège la paroi de l'estomac contre diverses agressions, notamment :

*des agressions mécaniques en jouant le rôle de lubrifiant lors du passage des aliments ;

*l'auto-digestion en inhibant la pepsine ;

*l'attaque acide en neutralisant l'HCl (Guyton, 1989)

I.2. Sécrétion acide chlorhydrique.

Cette solution électrolytique est sécrétée par les cellules bordantes, à une concentration de 160 mmol.L⁻¹ et elle possède un pH de 0,8.

La biosynthèse s'effectue à partir de dioxyde de carbone qui peut provenir de deux origines distinctes : soit endocellulaire, soit par pénétration dans la cellule à partir du sang. Ce gaz va réagir avec l'eau amenée par diffusion passive pour former de l'acide carbonique grâce à une enzyme : l'anhydrase carbonique.

Ce dernier acide va se dissocier en ion hydrogénocarbonate et proton. Le premier de ces ions va diffuser dans le sang alors que le proton va être transporté vers la lumière de la cellule.

A chaque ion hydrogène produit un ion chlore issu du sang rentre dans la cellule par transport passif pour former une molécule d'HCl.

Cette sécrétion d'acide chlorhydrique est très importante pour l'activation du pepsinogène. En effet, la pepsine est une enzyme produite par les cellules principales. Cependant ces dernières sécrètent cette enzyme sous sa forme précurseur, c'est-à-dire sous forme de pepsinogène. Une fois ce précurseur en contact avec de la pepsine produite précédemment et de l'acide chlorhydrique, il se clive pour donner la molécule active.

Cependant la pepsine est une enzyme protéolytique qui, pour être active, doit se situer dans un milieu très acide.

La régulation de ces sécrétions gastriques se fait par deux mécanismes (figure 36):

- La régulation nerveuse : via les fibres parasympathiques et les réflexes du plexus myentérique.

- La régulation hormonale : via la gastrine, l'acétylcholine, l'histamine, les prostaglandines...

C'est sur ces différentes voie de régulation que vont agir les médicaments des pathologies digestives que nous allons voir dans le paragraphe suivant.

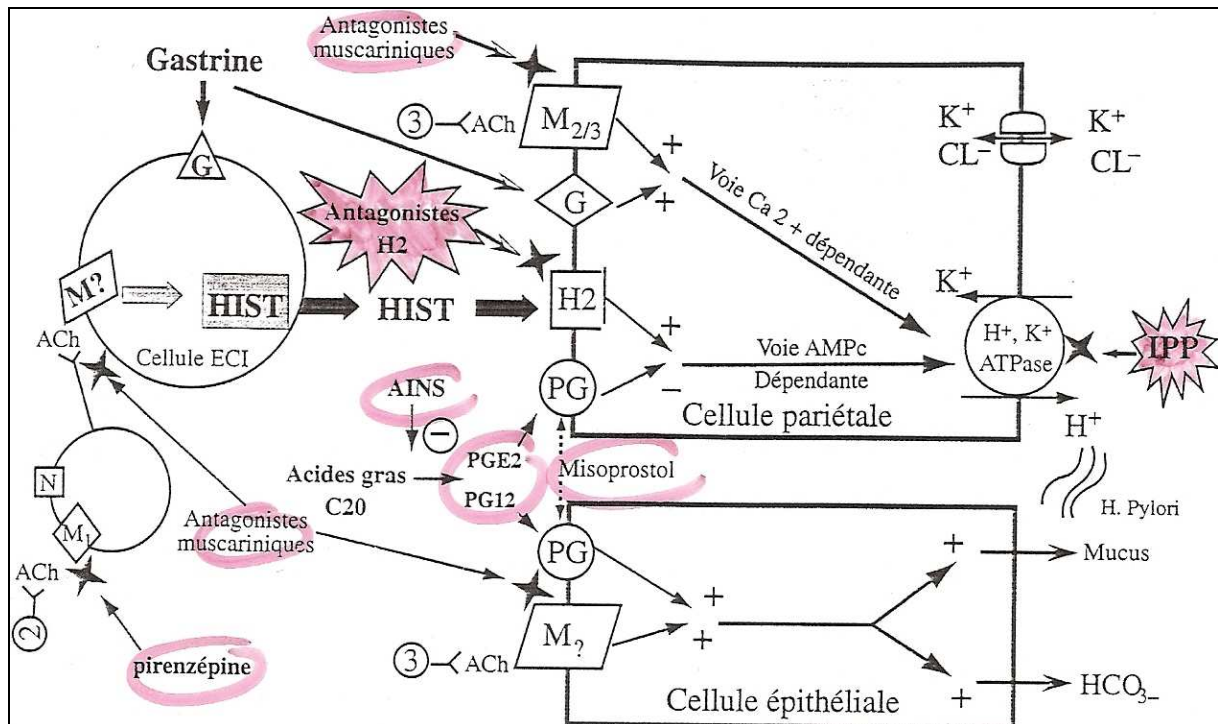


Figure 36 : schéma des différents paramètres de la sécrétion acide gastrique et certaines interférences médicamenteuses favorisant la production acide ou s'y opposant (La Revue du praticien, 2001).

Le facteur intrinsèque est issu des cellules pariétales. Il est nécessaire au transport et à l'absorption de la vitamine B12, elle-même indispensable à la formation des érythrocytes (Sherwood, 2000)

II. Pathologies

II.1. Le reflux gastro-œsophagien (RGO)

II.1.a. Définition

Le RGO est le reflux de l'estomac dans le bas de l'œsophage lorsque le sphincter inférieur de l'œsophage et le système anti-reflux au niveau du cardia reste ouvert.

Il peut être physiologique ou pathologique. Il est physiologique en période post-prandiale et lorsque il n'y a aucun signe clinique. En revanche il devient pathologique lorsqu'il survient plus fréquemment et qu'il est associé à des signes cliniques.

II.1.b. Physiopathologie

Le système anti-reflux étant défaillant, le contenu de l'estomac, très acide car contenant de l'acide chlorhydrique, remonte dans l'œsophage (figure 37) et provoque l'irritation avec lésions de la muqueuse.

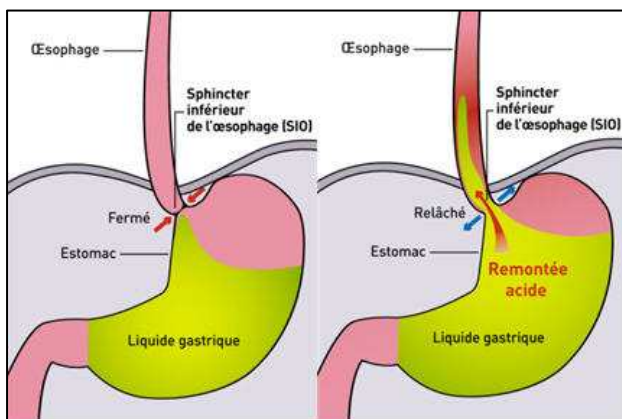


Figure 37 : schéma de la remontée acide dans l'œsophage au cours du RGO

A court terme, on observe une irritation, puis, à moyen terme, cette irritation va évoluer vers une œsophagite associée ou non à une hémorragie digestive et une sténose peptique, c'est-à-dire un rétrécissement œsophagien. A long terme le RGO peut avoir des conséquences plus graves et conduire à une altération de la structure cellulaire de la muqueuse, voire à une cancérisation.

La défaillance du système anti-reflux est la plupart du temps provoquée par une hernie hiatale, c'est-à-dire la protusion d'une partie de l'estomac dans le thorax à travers le diaphragme.

II.1.c. Clinique

L'irritation provoquée par l'acidité entraîne une sensation de brûlure épigastrique à irradiation rétrosternale ascendante ou pyrosis, communément appelée brûlure d'estomac. Le RGO peut également être accompagné de régurgitations acides. Ces signes sont favorisés par le décubitus ou antéflexion du tronc : on le décrit souvent comme le signe du lacet.

On peut observer d'autres signes digestifs tels que des flatulences, des ballonnements, des éructations et une digestion lente.

Le RGO est souvent associé des signes extra-digestifs qui peuvent se manifester isolément. On trouve des signes respiratoires avec une toux inexpliquée et souvent nocturne ou une dyspnée asthmatique, mais également des signes cardiaques avec des douleurs pseudo-angineuses ou une douleur rétrosternale. Ces différents signes peuvent amener l'individu présentant ces troubles à penser à un infarctus du myocarde.

Des manifestations stomatologiques tels que gingivite ou caries récidivantes peuvent être un signe de RGO.

II.1.d. Traitement

➤ Mesures hygiéno-diététiques

Comme pour toute pathologie, le premier traitement consiste à respecter certaines règles hygiéno-diététiques. Il faut éviter la consommation d'aliments qui augmentent la sécrétion d'acide tels que le thé, le café, le chocolat, les aliments gras,... Il est également possible de fractionner les repas. Enfin il est conseillé de ne pas s'allonger immédiatement après le repas et de surélever la tête du lit.

L'absence de fermeture totale du sphincter inférieur de l'œsophage est augmentée par la consommation d'alcool et de tabac qui entraîne son relâchement et qui, par conséquent, aggrave le problème ; il est donc recommandé d'arrêter la consommation de ces substances.

Enfin une réduction pondérale est envisageable si il y a surpoids.

➤ Traitement pharmacologique

Le traitement de première intention est variable selon la fréquence des symptômes et une éventuelle pathologie ulcéreuse.

Chez les sujets jeunes, sans signes cliniques majeurs et répétés, le traitement de référence sera un anti-acide ou un pansement gastrique à la demande. Il peut parfois être prescrit des antihistaminiques à faible posologie.

Pour des symptômes plus fréquents, des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP) seront d'emblée proposés à faible dose pendant un mois. Si les symptômes reviennent à l'arrêt du traitement, celui-ci pourra être reconduit.

Dans les cas plus sévères, voire invalidants, les IPP seront prescrits à forte posologie et pour une durée indéterminée qui peut se poursuivre plusieurs années. Dans ce cas, l'indication chirurgicale sera discutée. La chirurgie est notamment appliquée chez des personnes âgées ou présentant des facteurs de risques.

II.2. la maladie ulcéreuse : l'ulcère gastrique

II.2.a. Définition

L'ulcère gastrique ou gastroduodéal est une plaie de la muqueuse de l'estomac. Les tissus sous-muqueux sont atteints et deviennent scléreux, rigides. Les saignements apparaissent lorsque les vaisseaux sanguins sont touchés.

II.2.b. Physiopathologie

La première cause de l'ulcère gastrique est une bactérie : *Helicobacter pylori* qui produit une enzyme : l'uréase. Cette enzyme dégrade l'urée pour la transformer en anhydride carbonique et ammoniac. Ce dernier produit joue deux rôles essentiels : il protège la bactérie des sécrétions d'HCl et il détruit la couche protectrice de mucus ainsi que les cellules situées en dessous.

Cela provoque donc la perte de substance de la muqueuse stomacale (figures 38 et 39) et par conséquent une diminution de la résistance à la digestion. En effet, contrairement à l'ulcère duodéal, la sécrétion chlorhydrique est normale, voire basse, ce qui ne permet pas de l'imputer dans cette pathologie. De plus le reflux du contenu duodéal dans l'estomac provoque également un ulcère. Les acides biliaires contenus dans le chyme reflué sont très acides et diminuent la résistance gastrique de par leur effet détersifs.

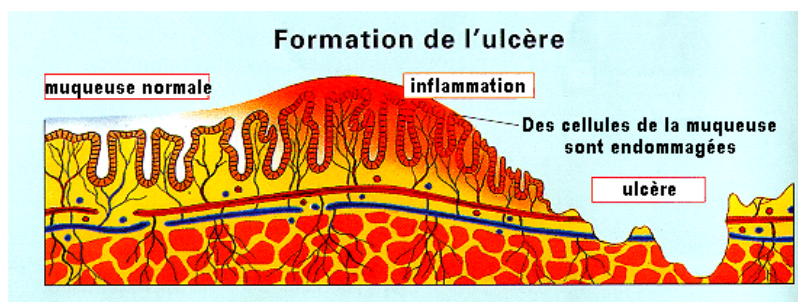


Figure 38 : physiopathologie de l'ulcération

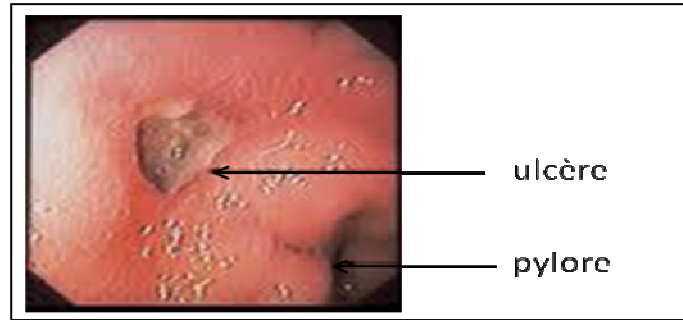


Figure 39 : ulcère gastrique vu par endoscopie

De plus la prise d'anti-inflammatoire non stéroïdien, de certaines boissons telles que le café ou le thé, ou encore le tabac, aggrave ce phénomène en perturbant les mécanismes de défense de la muqueuse gastrique.

II.2.c. Clinique

La douleur est le signe le plus typique de la maladie ulcéreuse. Elle est de type crampes épigastriques ou faim douloureuse. Cette douleur est post-prandiale tardive et rythmée par les repas. Elle est en général calmée par la prise d'aliments ou d'anti-acides avec un intervalle libre de 1 à 4 heures.

Ce phénomène peut aussi bien être diurne que nocturne et il est favorisé par le stress et la prise d'anti-inflammatoire.

D'autres manifestations plus rares peuvent apparaître telles que des brûlures épigastriques, un syndrome dyspeptique, des vomissements, une hémorragie digestive ou encore une perforation.

Il arrive que l'ulcère soit totalement asymptomatique mais ce cas est beaucoup plus rare.

II.2.d. Complications

Quatre complications sont possibles :

- Des hémorragies,
- Une sténose du pylore,
- Une péritonite,
- Un cancer de l'estomac.

II.2.e. Traitement (figure 40)

Les mesures hygiéno-diététiques vues pour le RGO sont également valables pour la maladie ulcéreuse. Par conséquent nous ne les redétaillerons pas ici.

Helicobacter pylori étant la première cause d'ulcère gastrique, le traitement de premier intention va consister à éradiquer cette bactérie à l'aide d'un traitement antibiotique. Cependant, en raison de la faible diffusion de ces produits dans la muqueuse gastrique ainsi que leurs altérations par l'acidité, seuls amoxicilline, clarithromycine et métronidazole sont utilisables.

Les protocoles les plus efficaces associent deux antibiotiques avec un IPP double dose matin et soir pendant 7 jours. L'association utilisée en première intention en France comporte : amoxicilline 1g matin et soir, clarithromycine 500mg matin et soir et IPP double dose.

L'éradication doit être contrôlée 8 à 12 semaines après le début du traitement par le test à l'urée C13 (mesure de l'activité uréasique de la bactérie). En cas d'échec de l'éradication, le traitement sera modifié pour contenir amoxicilline, métronidazole et IPP pendant 14 jours (Vatier, 2007).

III. Les médicaments des pathologies digestives

Trois grandes classes de médicaments sont utilisés dans les troubles de la digestion :

- Les antisécrétoires dans lesquels on distingue :
 - o Les antagonistes des récepteurs histaminiques H2
 - o Les anticholinergiques
 - o Les inhibiteurs de la pompe ATPase H⁺/K⁺
 - o Les analogues de la somatostatine
- Les anti-acides
- Les protecteurs dans lesquels on retrouve certains anti-acides ainsi que les prostaglandines.

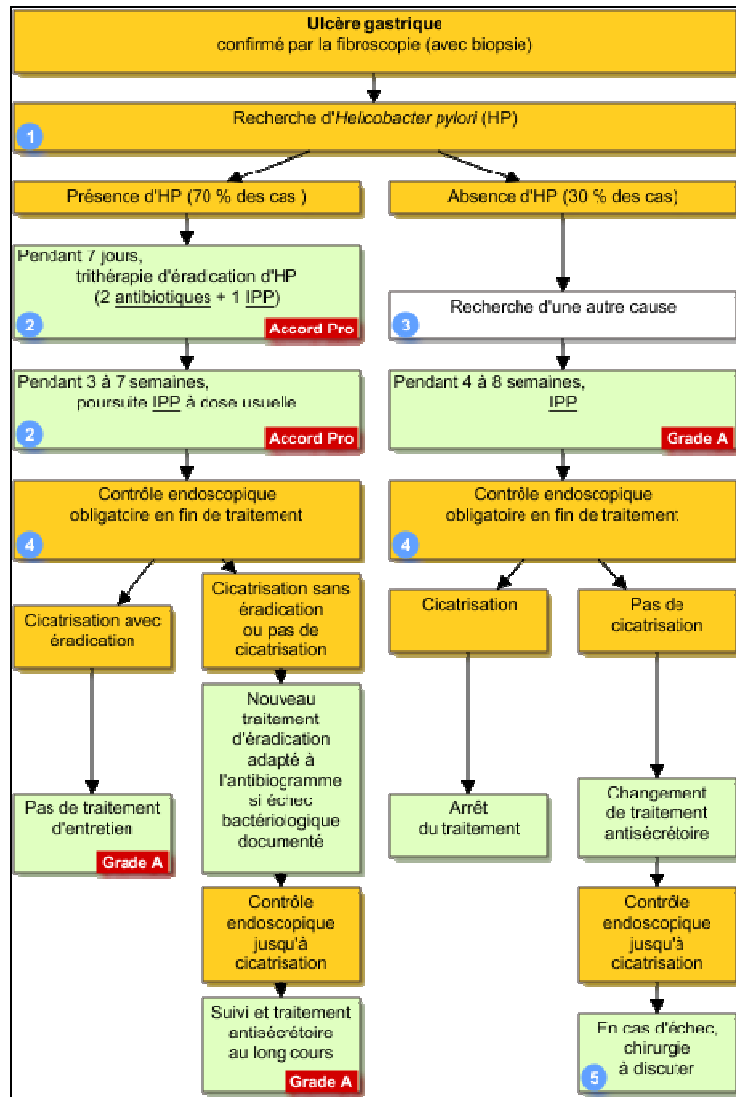


Figure 40 : arbre décisionnel de la prise en charge d'un ulcère gastrique

III.1. Les antisécrétoires

III.1.a. Les antiH2

Ils inhibent la sécrétion acide en bloquant de façon sélective les récepteurs membranaires H2 de l'histamine des cellules pariétales. Ils possèdent par conséquent deux propriétés pharmacologiques importantes : ils réduisent la sécrétion peptique basale et augmentent le pH intragastrique.

En France quatre molécules sont actuellement disponibles :

- Cimétidine (Tagamet®, Stomédine®),

- Ranitidine (Azantac®, Raniplex®),
- Nizatidine (Nizaxid®),
- Famotidine (Pepdine®, Pepcidac®).

Les effets secondaires les plus fréquemment retrouvés avec les antiH2 sont les suivants : diarrhée, céphalées, fatigue, myalgies, constipation et somnolence.

La cimétidine est un puissant inhibiteur enzymatique des cytochromes P450 ; elle interfère donc avec le métabolisme oxydatif hépatique de nombreux médicaments. Cependant cette interactions n'engendre des manifestations cliniques importantes qu'avec quelques associations : warfarine, théophylline, phénytoïne. A l'inverse certains médicaments inducteurs enzymatiques comme le phénobarbital augmentent le métabolisme hépatique de la cimétidine.

III.1.b. Anticholinergiques

L'atropine a longtemps été l'antisécrétoire le plus utilisé en thérapeutique bien que son effet ait été controversé. Un dérivé synthétique d'action plus sélective à alors été mis au point : la pirenzépine, antimuscarinique sélectif des mécanismes nerveux de la régulation de la sécrétion acide. Cette molécule est plus affine pour les récepteurs M2 de la muscarine que les récepteurs M1, M2 étant les récepteurs présents sur la cellule pariétale. Par conséquent la pirenzépine possède la propriétés d'inhiber le débit acide basal mais également d'inhiber la sécrétion peptique et bicarbonatée.

Les effets secondaires qui peuvent être observés sont dûs aux effets muscariniques extra-gastriques, c'est-à-dire sécheresse de la bouche, troubles de l'accommodation, photophobie, tachycardie, constipation, rétention urinaire, glaucome.

III.1.c. Les inhibiteurs de la pompe à protons (IPP)

Les IPP sont des inhibiteurs de l'enzyme ATPase H⁺/K⁺ localisée au pôle apical de la cellule pariétale qui permet la sécrétion d'ions H⁺ du milieu intracellulaire vers la lumière gastrique où, associés aux ions Cl⁻, ils forment l'acide chlorhydrique. Ils se différencient des

autres antisécrétoires par leur mécanisme d'action original, leur puissance et leur longue durée d'action.

En France cinq molécules sont actuellement disponibles :

- Oméprazole (Mopral®, Zoltum®),
- Lansoprazole (Ogast®, Lanzor®),
- Pantoprazole. (Eupantol®, Inipomp®)
- Esoméprazole (Inexium®)
- Rabéprazole (Pariet®)

Les effets secondaires qui peuvent apparaître sont rares et bénins de type : nausées, vomissements, diarrhée, céphalées, rash,...

L'oméprazole est également un inhibiteur enzymatique mais son interaction avec les cytochromes P450 est moindre que celle de la cimétidine. Il existe donc une interférence avec le diazepam, la phénytoïne et la warfarine en réduisant leur élimination. Le lansoprazole possède également un petit effet sur le système microsomal d'oxydation hépatique, il sera donc nécessaire d'être vigilant lors de l'administration concomitante de l'IPP et de médicaments métabolisés par ce système.

III.1.d. La somatostatine (SMT)

Les propriétés de la SMT sont variables : elle inhibe la sécrétion acide en inhibant directement la libération de gastrine. Cette molécule bloque également la sécrétion enzymatique pancréatique et diminue le flux sanguin portal.

III.2. Les antiacides

Les préparations anti-acides contiennent différents sels minéraux :

- Aluminium qui exerce un effet tampon, provoque une réduction de la sécrétion de pepsine et protège les glycoprotéines du mucus de l'érosion.
 - Magnésium
 - Calcium
 - Sodium
- } Ces trois métaux possèdent principalement une action de neutralisation du pH.

III.3. Les protecteurs de la muqueuse

Deux grandes classes de produits composent les protecteurs de la muqueuse :

- Les prostaglandines,
- Les substances induisant la libération de prostaglandines ; il s'agit notamment des sels d'aluminium.

Les prostaglandines (PG) utilisées pour ce type de pathologie sont les PG E2. Elles agissent sur la cellule pariétale afin d'inhiber la sécrétion acide, mais sont également actrices de la défense et de la réparation de la muqueuse.

Une seule molécule est actuellement commercialisée : le misoprostol (Cytotec®).

L'effet secondaire le plus fréquent est une diarrhée sévère qui peut entraîner l'arrêt du médicament.

Les interactions médicamenteuses concernent les anti-inflammatoires. Le misoprostol diminue leur biodisponibilité.

IV. Les pansements gastriques

IV.1. Généralités-présentation

Les pansements gastriques sont utilisés dans le RGO pour leur pouvoir couvrant de la muqueuse intestinale. Au contact du liquide gastrique ils forment un gel visqueux qui protège la muqueuse de l'acidité et limite le reflux.

Plusieurs classes de principes actifs sont utilisées :

- Les argiles et apparentés (Actapulgite®, Bedelix®, Smecta®),
- La polyvinyl-polypyrrolidone (Bolinan®, Poly-Karaya®),
- Les silicones (Pepsane®, Polysilane Upsa®, siligaz®),
- Les alginates : c'est cette dernière classe que nous allons plus particulièrement développer.

IV.2. Les pansements gastriques à base d'alginates

Les spécialités à base d'alginates sont au nombre de deux et sont toujours associées à un anti-acide : l'hydroxyde d'aluminium. Ce sont :

- Le Gaviscon® (figure 41) : composé d'acide alginique, d'alginates de sodium, d'hydroxyde d'aluminium colloïdal séché et de bicarbonate de sodium,
- Le Topaal® : composé d'acide alginique, d'hydroxyde d'aluminium colloïdal, d'hydrocarbonate de magnésium et de silice hydratée. (Dorosz, 2009)



Figure 41 : pansement gastrique en suspension buvable

IV.2.a. Mécanisme d'action- Effet de l'alginates

Au contact du liquide gastrique l'alginates forme un gel léger qui lui permet donc de flotter à la surface du contenu gastrique au niveau de la jonction gastro-oesophagienne. Par conséquent, en cas de reflux, seul le gel et non le liquide acide refluera dans l'œsophage et il va donc tapisser celui-ci, empêchant ainsi le contact entre le liquide gastrique et la muqueuse œsophagienne. Par ailleurs, sa viscosité et sa cohérence forment une barrière physique qui empêche le reflux et diminue donc le nombre de régurgitations. Enfin l'alginates agit sur le pH du liquide gastrique : son pH alcalin se substitue au pH acide du liquide gastrique.

Les alginates sont des polysaccharides non absorbables et sont donc éliminés par voie digestive.

IV.2.b. Indications

Les deux produits sont utilisés dans le traitement du reflux gastro-œsophagien. En revanche le Topaal® est indiqué également dans le traitement des troubles gastrique liés à l'acidité dans les hernies hiatales, le pyrosis, les œsophagites.

IV.2.c. Effets indésirables

L'hydroxyde d'aluminium peut provoquer une déplétion phosphorée, notamment lors des traitements prolongés.

De plus, pour le Gaviskon® contenant du bicarbonate de sodium, il est possible de voir apparaître une constipation (mais dont le risque de survenue est considérablement diminué grâce à la présence d'alginate), mais surtout une hypercalcémie avec risque de néphrolithiase et d'insuffisance rénale.

IV.2.d. Précautions d'emploi – interactions médicamenteuses

Les pansements gastriques, de par leur pouvoir couvrant, diminuent l'absorption d'autres médicaments absorbés par voie orale et administrés simultanément. Par conséquent, il est conseillé de décaler la prise des médicaments de deux heures par rapport à celle des pansements gastriques. Cet espacement des prises peut être allongé et il atteint notamment quatre heures entre la prise de fluoroquinolone et le pansement.

En raison de la présence d'hydroxyde d'aluminium, on peut observer une diminution de l'absorption de certains médicaments tels que le furosémide, l'indométacine, les tétracyclines, la digoxine, l'isoniazide et les anticholinergiques.

PARTIE III :

LES ALGINATES EN PHARMACIE GALENIQUE

A/ LES ALGINATES : DES EXCIPIENTS

I. Les excipients

I.1. Définition

Un excipient est défini comme « tout composant, autre que le(s) principe(s) actif(s), qui est présent dans un médicament ou utilisé pour sa fabrication ». La fonction d'un excipient est de servir de vecteur au(x) principe(s) actif(s), ou d'entrer dans la composition du vecteur, contribuant ainsi à certaines propriétés du produit telles que la stabilité, le profil biopharmaceutique, l'aspect et l'acceptabilité pour le patient, la facilité de fabrication. La formulation d'un médicament comprend généralement plusieurs excipients.

Un excipient n'est donc pas défini par une composition chimique particulière mais par son utilisation, qui découle des propriétés physico-chimiques qui le rendent apte à remplir son rôle d'excipient.

Deux autres termes sont utilisés suivant que les préparations sont liquides ou solides. Dans le premier cas on parle de véhicule, alors que pour les préparations solides on parle de base (Goris, 1949).

I.2. Rôles des excipients

Les excipients ont pour but de :

- Faciliter l'administration des principes actifs d'un point de vue technique comme par exemple les excipients pour pommades, mais également d'un point de vue de l'acceptabilité par le malade comme les édulcorants ou les aromatisants,...
- Augmenter l'efficacité du principe actif : on peut citer dans cette partie les excipients à libération prolongée qui permettent une longue durée d'action du principe actif,
- Assurer la conservation et la stabilité du principe actif le plus longtemps possible : ce sont notamment les conservateurs.

I.3. Propriétés des excipients

Une des propriétés principales des excipients est l'inertie. Cette propriété est primordiale et s'applique à tous les excipients. Ils doivent être inertes vis-à-vis :

- Du principe actif : l'excipient ne doit pas interférer sur son action afin de ne pas augmenter ou diminuer son activité qui pourrait conduire à une absence d'efficacité du médicament ou à une toxicité. C'est pourquoi les excipients ne peuvent pas être modifiés sans une étude préalable,
- Du matériau de conditionnement primaire, c'est-à-dire celui en contact avec le médicament. Il est important que les excipients ne dissolvent pas ou ne soit pas retenu par le conditionnement,
- De l'organisme : l'excipient ne doit pas avoir une activité par lui-même, seul le principe actif doit en avoir une. Cette neutralité est testée à l'aide des essais d'innocuité. Cependant l'inertie totale ne peut être obtenue. Le choix de l'excipient se fait donc par un équilibre entre bénéfice et risque. De plus ces problèmes peuvent être liés aux impuretés de l'excipient et non à l'excipient lui-même (LeHir, 2009).

II. Les alginates : des excipients

Plusieurs formes d'alginate sont utilisés pour un usage d'excipient dans la confection des médicaments : l'acide alginique, l'alginate de sodium et l'alginate de propylèneglycol (Rowe, 2003).

II.1. Acide alginique (figure 42)

II.1.a. Chimie

En tant qu'excipient utilisé en galénique, plusieurs synonymes peuvent être utilisés mais le symbole E400 l'est le plus souvent.

Le nombre CAS qui définit chaque produit chimique est le 9005-32-7 pour l'acide alginique.

II.1.b. Catégories d'excipients- les utilisations dans la formulation des médicaments

L'acide alginique possède différentes propriétés et peut être classé dans différentes catégories d'excipients : Ils peuvent servir comme :

- Agent stabilisant,

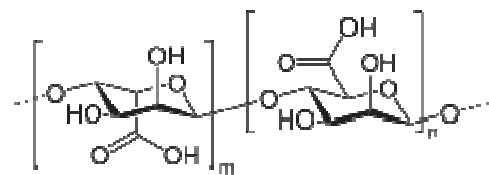


Figure 42 : représentation de l'acide alginique

- Agent de suspension,
- Agent de viscosité,
- Liant pour comprimés et
- Agent de désintégration pour comprimés.

De ces propriétés, il découle des applications dans la formulation galénique des produits. L'acide alginique est notamment utilisé dans la formulation des médicaments destinés à la voie orale et les topiques.

Il est utilisé comme agent de suspension et comme épaississant dans les pommades, crèmes et gel alors qu'il est plus utilisé comme stabilisant pour les émulsions huile dans eau.

II.1.c. Propriétés spécifiques de l'acide alginique

Six propriétés caractérisent cet excipient :

- Son acidité avec un $\text{pH}=1,5-3,5$,
- Sa réactivité croisée : l'addition d'un sel de calcium provoque une réaction croisée avec l'acide provoquant une augmentation de son poids moléculaire,
- Sa densité de 1.061g/cm^3 ,
- Son taux d'humidité de 7.01%,
- Sa solubilité : il est soluble dans les hydroxydes mais insoluble dans les solvants organiques,
- Sa viscosité qui varie en fonction de la concentration, de la température,...

II.1.d. Conditions de conservation et de stabilité

L'acide alginique doit être conservé dans un endroit fermé sec et frais et à température ambiante car elle est hydrolysée à haute température, induisant une perte de poids moléculaire ainsi que de viscosité.

Une contamination microbienne peut entraîner une dépolymérisation conduisant à une diminution de la viscosité. Il est donc nécessaire de conserver ce produit en présence d'un antimicrobien.

La stérilisation est possible mais, quelque soit la méthode utilisée, on observe une diminution de la viscosité.

II.1.e. Incompatibilités

L'acide alginique est incompatible avec les oxydants forts et forme des sels insolubles avec de nombreux métaux.

II.1.f. Données de sécurité-toxicité

Cette substance est décrite comme non toxique ; cependant une consommation excessive par voie orale peut devenir dangereuse. De plus une inhalation importante peut conduire à des problèmes respiratoires.

La dose létale 50 chez le rat en intra-péritonéal (IP) est de : 1,6g/kg.

II.1.g. Précautions d'emploi

L'acide alginique peut être irritant pour les yeux et le système respiratoire. Il est donc recommandé de le manipuler avec des gants, des lunettes, un masque et dans un endroit ventilé.

II.2. Alginate de propylèneglycol (figure 43)

II.2.a. Chimie

En tant qu'excipient utilisé en pharmacie galénique, plusieurs synonymes peuvent être utilisés mais le symbole E405 sera utilisé le plus souvent.

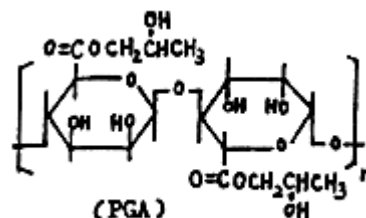


Figure 43 : représentation de l'alginate de propylèneglycol

Le nombre CAS qui définit chaque produit chimique est le suivant pour l'alginate de propylèneglycol : 9005-37-2.

II.2.b. Catégories d'excipients- utilisations dans la formulation des médicament

L'alginate de propylèneglycol possède différentes propriétés et peut être classé dans différentes catégorie d'excipients : Il peut servir comme :

- Agent stabilisant,
- Agent de suspension,

- Agent de viscosité,
- Agent émulsifiant.

De ces propriétés, il découle des applications dans la formulation des produits. l'alginate de propylèneglycol est notamment utilisé dans la formulation des médicaments destinés à la voie orale et les topiques.

II.2.c. Propriétés spécifiques de l'alginate de propylèneglycol

Deux propriétés caractérisent cet excipient :

- Sa solubilité : il est soluble dans acides organiques et l'eau où il forme une solution colloïdale.
- Sa viscosité qui varie en fonction de la concentration, de la température, du pH.

II.2.d. Incompatibilités

Il n'existe pas d'incompatibilités avec l'alginate de propylèneglycol.

II.2.e. Conditions de conservation et de stabilité

L'alginate de propylèneglycol doit être conservé dans un endroit fermé hermétiquement, sec et frais car elle perd de sa solubilité en présence de chaleur pendant une longue durée.

Une contamination microbienne peut entraîner une dépolymérisation de l'acide alginique, conduisant à une diminution de la viscosité. Il est donc nécessaire de conserver ce produit en présence d'un antimicrobien ou de le stériliser. La stérilisation est possible mais quelque soit la méthode utilisée, on observe une diminution de la viscosité.

En solution cet excipient doit être conservé à pH acide, compris entre 3 et 6 pour ne pas être saponifié rapidement.

II.2.f. Données de sécurité-toxicité

Cette substance est décrite comme non toxique ; cependant une consommation excessive par voie orale peut devenir dangereuse. De plus une inhalation importante peut conduire à des problèmes respiratoires.

La dose létale 50 chez le rat par voie orale est de : 7,2g/kg ; chez le hamster par voie orale : 7,0g/kg ; chez le lapin par voie orale : 7,6g/kg ; chez la souris par voie orale : 7,8g/kg

II.2.g. Précautions d'emploi

L'alginate de propylèneglycol peut être irritant pour les yeux et le système respiratoire. Il est donc recommandé de le manipuler avec des gants, des lunettes, un masque et dans un endroit ventilé.

II.3. Alginate de sodium (figure 44)

II.3.a. Chimie

En tant qu'excipient utilisé en galénique, plusieurs synonymes peuvent être utilisés mais le symbole E401 sera plus souvent utilisé.

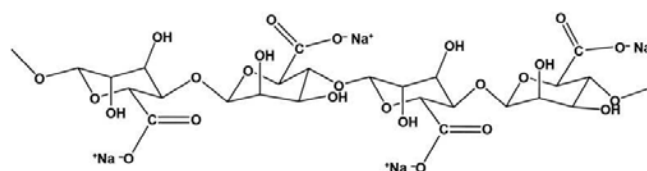


Figure 44 : représentation de l'alginate de sodium

Le nombre CAS qui définit chaque produit chimique est le suivant pour l'alginate de sodium : 9005-38-3.

II.3.b. Catégories d'excipients- utilisations dans la formulation des médicaments.

L'alginate de sodium possède différentes propriétés et peut être classé dans différentes catégorie d'excipients. Il peut servir comme :

- Agent stabilisant,
- Agent de suspension,
- Agent de viscosité,
- Liant pour comprimés et
- Agent de désintégration pour comprimés et capsules.

De ces propriétés, il découle des applications dans la formulation galénique des produits. L'alginate de sodium est notamment utilisé dans la formulation des médicaments destinés à la voie orale ou les topiques.

II.3.c. Propriétés spécifiques de l'alginate de sodium

Trois propriétés caractérisent cet excipient :

- Son acidité avec un pH=7.2 ;
- Sa solubilité : il est pratiquement insoluble dans l'éthanol, l'éther, le chloroforme, les solvants organiques et les solutions acides aqueuses dont le pH est inférieur à 3. En présence d'eau, il forme une solution colloïdale.
- Sa viscosité qui varie en fonction de la concentration, de la température, de la présence d'ions métallique,...

II.3.d. Incompatibilités

Cet excipient est incompatible avec les dérivés acridine, le cristal violet, l'acétate et le nitrate phénylmercurique, les sels de calcium, les métaux lourds et l'éthanol.

II.3.e. Conditions de conservation et de stabilité

L'alginate de sodium doit être conservé dans un endroit fermé hermétiquement, sec et frais car ce produit est hygroscopique. De plus il ne doit pas être conservé dans un contenant en métal.

Cette substance doit être conservé dans un endroit frais car elle perd de sa viscosité en présence de chaleur. Une contamination microbienne peut entraîner une dépolymérisation de l'alginate de sodium conduisant à une diminution de la viscosité. Il est donc nécessaire de conserver ce produit en présence d'un antimicrobien ou de le stériliser.

Les préparations pour voie externe peuvent être conservé avec du chlorocrésol, du chloroxylénol ou du paraben.

II.3.f. Données sécurité-toxicité

Cette substance est décrite comme non toxique cependant une consommation excessive par voie orale peut devenir dangereuse. De plus une inhalation trop importante peut conduire à des problèmes respiratoires.

La dose létale 50 chez le rat par voie orale est de : plus de 5 g/kg ; chez le rat par voie intraveineuse (IV) : 1 g/kg ; chez le lapin par voie IV : 0,1 g/kg ; chez la souris par voie IV : 0,2 g/kg ; chez le chat par voie IP : 0,25 g/kg.

II.3.g. Précautions d'emploi

L'alginate de sodium peut être irritant pour les yeux et le système respiratoire. Il est donc recommandé de le manipuler avec des gants, des lunettes, un masque et dans un endroit ventilé.

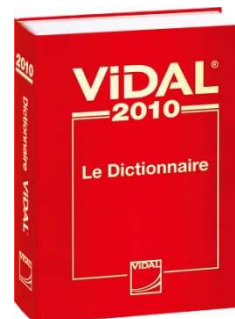
III. Médicaments contenant l'alginate et ses dérivés comme excipient (Vidal, 2010)

III.1. Liste des médicaments contenant la substance acide alginique comme excipient :

- | | |
|--|--|
| • ACTICARBINE cp enr | • <u>HEPADIAL 50 mg cp enr</u> |
| • APAROXAL 100 mg cp séc | • <u>LAMIDERM 0,67 % émuls p appl cut</u> |
| • ARKOGELULES FUCUS gél | • <u>LARIAM 250 mg cp séc</u> |
| • AVLOCARDYL 40 mg cp séc | • <u>LUMIRELAX 500 mg cp</u> |
| • BIAFINE émuls p appl cut | • <u>MESTACINE 100mg cp pellic séc</u> |
| • BIAFINEACT émuls p appl cut | • <u>PREVISCAN 20 mg cp quadriséc</u> |
| • CANTABILINE 400 mg cp | • <u>PROPRANOLOL EG 40mg cp</u> |
| • CARTEOL LP 1% collyre LP en unidose | • <u>PROPRANOLOL RATIOPHARM 40 mg cp quadriséc</u> |
| • CARTEOL LP 1% collyre sol LP | • <u>RILMENIDINE MYLAN 1 mg cp</u> |
| • CARTEOL LP 2% collyre LP en unidose | • <u>RILMENIDINE QUALIMED 1 mg cp</u> |
| • CARTEOL LP 2% collyre sol LP | • <u>RILMENIDINE RATIOPHARM 1 mg cp</u> |
| • COMBANTRIN 125 mg cp | • <u>TERCIAN 100mg cp pellic séc</u> |
| • FASIGYNE 500 mg cp enr | • <u>TERCIAN 25mg cp pellic séc</u> |
| • FLUOXETINE CRISTERS 20 mg cp dispers séc | • <u>VERRULYSE-METHIONINE cp enr</u> |
| • FLUOXETINE ZYDUS 20mg cp dispers séc | • <u>VOGALENE 15 mg gél</u> |
| • HALDOL 1 mg cp | |

III.2. Liste des médicaments contenant l'alginate de sodium comme excipient :

- ALOPLASTINE pâte p appl loc
- ARTHRODONT 1% pâte gingiv
- BIAFINE émuls p appl cut
- BIAFINEACT émuls p appl cut
- ISOPTINE 240mg cp pellic séc LP
- LAMIDERM 0,67 % émuls p appl cut
- NIQUITIN MENTHE FRAICHE 2mg cp à sucer
- NIQUITIN MENTHE FRAICHE 4mg cp à sucer
- NIQUITIN SANS SUCRE 2mg cp à sucer
- NIQUITIN SANS SUCRE 4mg cp à sucer
- NIQUITINMINIS 1,5 mg SANS SUCRE cp à sucer
- NIQUITINMINIS 4 mg SANS SUCRE cp à sucer
- PSEUDOPHAGE glé p sol buv
- TARKA LP cp pellic LP
- TROLAMINE BIOGARAN 0,67 % émuls p appl cut
- VERAPAMIL EG LP 240 mg cp pellic séc LP
- VERAPAMIL MYLAN L.P. 120 mg cp enr LP
- VERAPAMIL MYLAN L.P. 240 mg cp pellic séc LP
- VERAPAMIL RATIOPHARM 240mg cp pellic séc LP
- VERAPAMIL SANDOZ LP 240 mg cp pellic séc LP
- VITATHION géf efferv



B/ L'ALGINATE : UN PROCEDE D'ENCAPSULATION

I. La micro-encapsulation (figure 45)

I.1. Définition-Historique

C'est le piégeage d'un composé ou d'un système au sein d'un matériau dispersé en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structure et sa fonctionnalisation. En développant cette technique l'homme n'a fait que reproduire la nature.

Cette technique a donné naissance à de nombreux produits ces dernières années ; cependant son utilisation dans l'industrie est connue depuis longtemps.

La possibilité des structures à encapsuler est grande et peut aller de molécules très simples à très complexes telles que des médicaments.

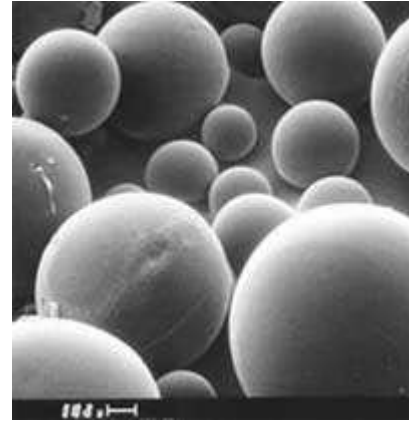


Figure 45 : microcapsules d'alginate observées au microscope électronique à balayage

La diversité des formes de capsules est très grande. Pour un puriste, une microcapsule est une membrane contenant un liquide. Dans la réalité, cela peut aller de la forme la plus simple : une molécule creuse dans laquelle s'insère un principe actif, jusqu'à des formes complexes de type liposomes,...

En résumé l'encapsulation comprend un ensemble de structures solides obtenues par séchage, agglomération ou enrobage de particules solides.

I.2. Rôle de l'encapsulation

La microencapsulation est une technique qui a pour objectif les 5 propriétés suivantes :

- Immobiliser ou isoler : le but est de limiter le contact entre certaines parties d'un système. Cet objectif est notamment retrouvé dans les médicaments où il est souhaitable que les deux réactifs n'entrent en contact qu'au moment de la rupture de la capsule.

- Protéger : certains composés sont très fragiles et sont rapidement dégradés au contact du milieu environnant ; la micro-encapsulation leur permet donc d'être protégés de cet environnement néfaste. Pour exemple il est possible de citer certains médicaments qui sont

détruits par le pH acide de l'estomac. Cette technique leur permet donc de traverser cet organe sans être dénaturés et d'agir au niveau intestinal.

- Contrôler la libération. Dans de nombreux cas un profil de libération particulier est recherché. En effet certains médicaments doivent suivre une cinétique bien définie pour leur libération.

- Structurer : la microencapsulation est une technique de galénique qui permet d'être très homogène dans la répartition du principe actif et d'éviter les effets de dilution qui peuvent exister. En effet, le mélange d'un litre de liquide avec une tonne de poudres et rarement homogène, l'encapsulation permet de solutionner ce problème.

- Fonctionnaliser : un système peut acquérir des fonctions nouvelles avec ce type de structure. Par exemple l'activité d'un biocatalyseur peut être régulée en modifiant la perméabilité de la membrane qui l'entoure.

I.3. Mécanismes de libération des substances encapsulées dans des microcapsules

Plusieurs mécanismes sont possibles mais dépendent de la façon dont le principe actif doit être libéré, ainsi que des capacités du principe actif.

Les différentes pratiques sont :

- La pression externe : le contenu de la capsule est libéré par rupture de la membrane suite à l'écrasement de cette dernière,

- La pression intérieure : ceci n'est possible que si le principe actif produit des composants gazeux qui augmente la pression à l'intérieur de la capsule jusqu'à l'éclatement,

- L'abrasion : la capsule est progressivement usée jusqu'à la libération de la substance la contenant,

- La chaleur : le contenu est libéré suite à la fusion de l'enveloppe de la microcapsule,

- La combustion-décomposition : les substances extinctrices d'incendie libèrent leurs contenus suite à la combustion ou la décomposition de l'enveloppe,

- La lumière : la capsule sensible aux UV se décompose au contact de la lumière, libérant ainsi le contenu.

- Les solvants : certaines microcapsules sont destinées à être dissoutes dans un solvant spécifique,

- Le pH : la libération du principe actif par dissolution de la membrane au contact d'une substance à pH donné permet de libérer le produit dans un site spécifique,

- La dégradation enzymatique : cela permet de libérer la substance à un endroit donné c'est-à-dire où les enzymes sont présentes et digèrent la membrane,

- La perméabilité : la membrane étant perméable, le contenu est libéré progressivement par diffusion, dissolution ou évaporation. La membrane peut également être semi-perméable pour le substrat qui va diffuser à travers la membrane (Vandame, 2007).

II. L'alginate : support pour la microencapsulation

De nombreux polymères d'origine biologique sont utilisés pour la microencapsulation : les polysaccharides, les protéines et lipides.

Cinq critères spécifiques aux biopolymères peuvent être recherchés pour la conception de microcapsules :

- Perméabilité aux gaz,
- Caractéristiques chimiques et fonctionnelles,
- Emulsifiant naturel,
- Nombreuses possibilités de modification et de réticulation chimiques.

Selon l'utilisation souhaitée, chaque biopolymère, possédant des indications différentes, va posséder une indication précise.

Les principaux matériaux d'origine biologique utilisés pour la microencapsulation sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : principaux matériaux, les procédés utilisables et quelques exemples d'application de la microencapsulation

Matériaux d'encapsulation	Procédés utilisables	Exemples de domaines d'application
Gélatine	Coacervation simple, ou complexe	Arôme, Parfum, Pharmacie, Papeterie
Alginate de sodium	Coacervation complexe, Gélification de gouttes	Médecine, Arôme, Cosmétique, Parfum, Pharmacie (libération entérique)...
Chitosane	Coacervation complexe Gélification de gouttes Nébulisation Lit d'air fluidisé	Pharmacie (libération gastrique)
Amidon	Nébulisation Extrusion	Alimentaire

II.1. Techniques d'encapsulation à partir d'alginate

L'alginate de sodium est utilisé pour divers domaines et le procédé de microencapsulation adapté pour l'alginate de sodium est de deux types :

- la coacervation complexe,
- la gélification de gouttes

II.1.a. La coacervation complexe : procédé physico-chimique

Cette technique se définit comme la séparation d'un système colloïdal en deux phases liquides. La phase la plus concentrée est la phase coacervée, l'autre phase étant la solution d'équilibre. La coacervation se produit par interaction direct entre biopolymères. Les interactions sont de nature hydrogène, hydrophobe ou encore électrostatique. Le polymère est compressé à la surface du colloïde ou de la gouttelette et le dépôt de coacervat à la surface provient de l'abaissement de pH (figure 46).

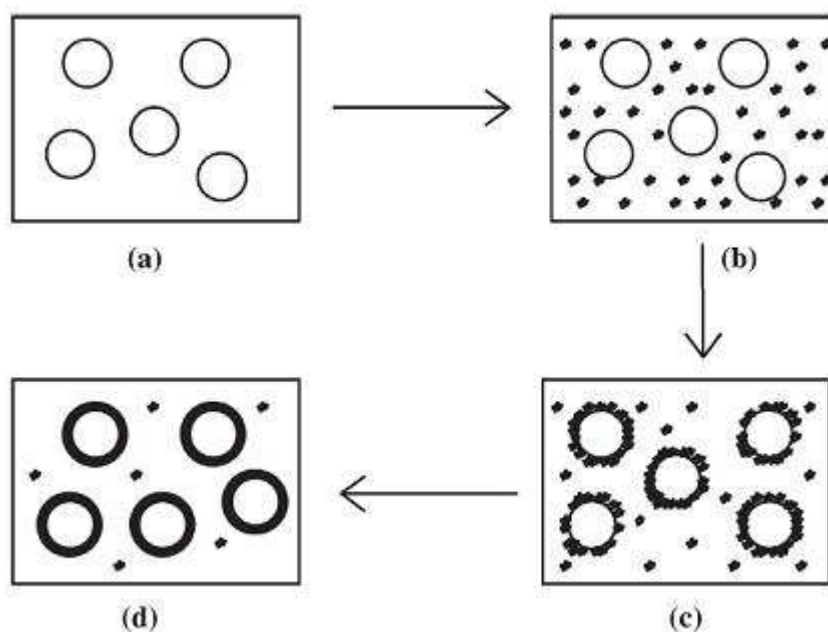


Figure 46 : représentation schématique du processus de coacervation complexe. (a) Dispersion du produit à encapsuler dans une solution du matériau d'enrobage ; (b) séparation du coacervat de la solution; (c) coating du matériel par des microgouttes du coacervat

II.1.b. Gélification de gouttes : procédé mécanique.

Il est également appelé procédé d'extrusion. La solution de biopolymères tombe goutte à goutte dans un bain contenant le milieu séquestrant, conduisant à la gélification des gouttes ou à la formation d'une membrane autour de ces gouttes sphériques (figure 47).

La co-extrusion est basée sur le même principe mais permet d'entourer le matériel liquide à encapsuler dans une membrane de biopolymère (Hernandez, 2002).

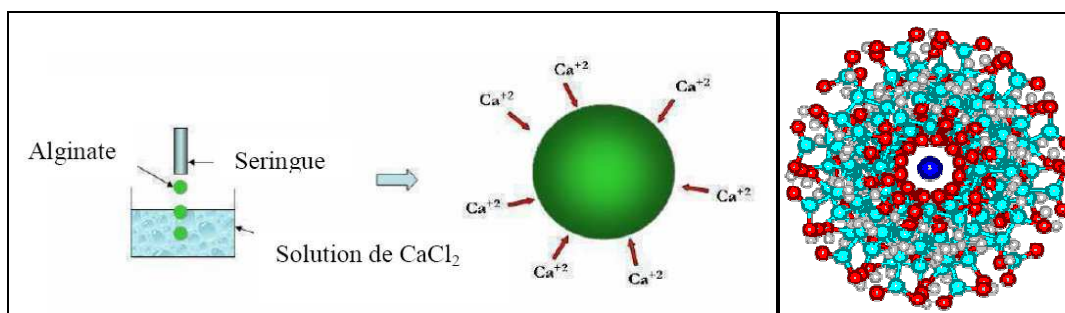


Figure 47 : procédé de gélification de gouttes d'alginate et structure atomique d'une bille d'alginate

II.2. Applications : exemple de molécules encapsulées avec l'alginate

Différentes protéines ont été encapsulées : l'albumine de sérum bovin (BSA), l'hémoglobine et l'uréase d'*Helicobacter pylori*.

Des liposomes ont également été encapsulés dans l'alginate (Monshipouri, 1999).

PARTIE IV :

L'ALGINATE DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE

A/ INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Ce projet a pour objectif final la création d'un substitut vasculaire. Pour ce faire, l'ingénierie vasculaire aura recours à la construction par la technique des feuillets cellulaires ou « cell-sheet » par l'intermédiaire d'un biomatériau qui sera dans notre cas l'alginate. Cette partie contient la bibliographie du projet, le matériel et méthode nécessaire pour comprendre la partie suivante, c'est-à-dire les résultats.

Les maladies cardiovasculaires, et plus particulièrement l'athérosclérose, représentent la première cause de mortalité dans les pays développés. L'athérosclérose est caractérisée par l'obstruction de la lumière des vaisseaux sanguins. Le traitement de dernier recours reste le remplacement chirurgical du vaisseau lésé. L'ingénierie vasculaire tente donc dans ce but de mettre au point des substituts vasculaires « idéaux » : non toxiques, non thrombogéniques et présentant des propriétés proches de celles des vaisseaux natifs. Nous allons donc décrire la structure des vaisseaux sanguins puis définir un biomatériau et enfin nous verrons l'ingénierie tissulaire.

I. Les vaisseaux sanguins

I.1. Structure générale

La paroi vasculaire (figure 48) comprend trois tuniques concentriques et solidement réunies : une tunique interne ou intima, une tunique moyenne ou média et une tunique externe ou adventice.

I.1.a. Intima

L'intima tunique la plus interne et la plus fine, est constituée d'une couche monocellulaire de cellules endothéliales ou endothélium, qui reposent sur une lame basale, et d'une couche sous-endothéliale de tissu conjonctif fibro-élastique qui contient du collagène, des fibres élastiques, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes qui produisent des protéoglycannes et des glycosaminoglycannes. L'endothélium est l'interface entre le sang et la paroi vasculaire et joue donc le rôle d'une barrière de perméabilité sélective. De plus l'endothélium a une propriété antithrombotique par deux mécanismes : la charge négative de

la paroi vasculaire qui empêche l'adhésion des cellules vasculaires et la production de molécules antithrombotiques (activateur tissulaire du plasminogène, prostacycline, monoxyde d'azote,...) par les cellules endothéliales (CE). Enfin l'endothélium contrôle en partie le tonus vasculaire par la synthèse de molécules vasoactives.

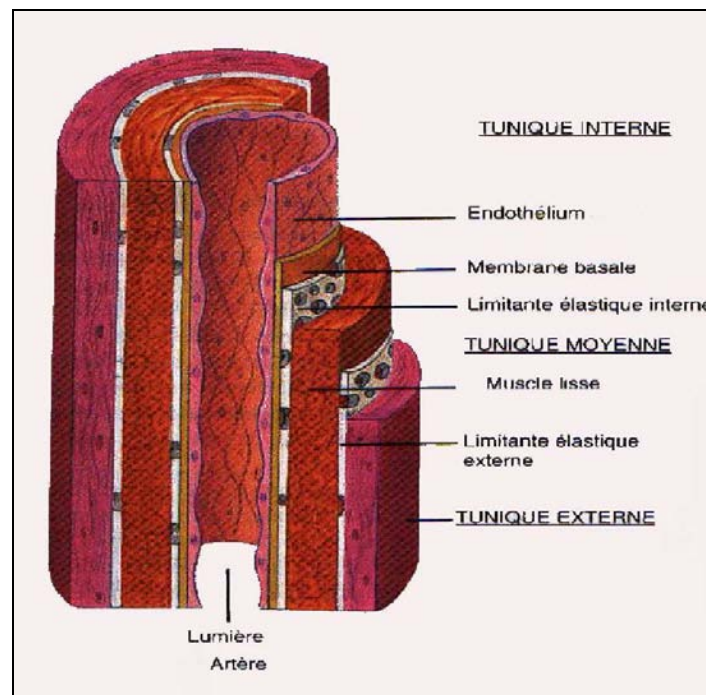


Figure 48 : structure de la paroi d'une artère

I.1.b. Média

La média, tunique moyenne et avasculaire, est la plus épaisse. Elle est essentiellement constituée de cellules musculaires lisses (CML), mais aussi de matrice conjonctive c'est-à-dire d'élastine, de collagène et de mucopolysaccharides. Elle est séparée de l'intima par la limitante élastique interne (LEI) qui est constituée d'une lame d'élastine.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la média. L'organisation des fibres élastiques et des CML varie selon la fonction du vaisseau. Dans les artères élastiques, la média est formée par des lames de fibres élastiques concentriques entre lesquelles se trouvent des CML. Les CML et les lames élastiques forment des unités lamellaires concentriques dont le nombre est proportionnel au diamètre du vaisseau. Depuis 1985, on parle de feuillet

musculo-élastique : c'est un groupe de cellules enveloppées dans une matrice constituée d'une lame basale et de fibrilles de collagène, le tout étant enveloppé dans un tapis de fibres élastiques. Dans les artères musculaires, cette structure lamellaire n'existe pas, on trouve uniquement quelques lamelles élastiques entre des couches de CML. Dans ces 2 types d'artères, les CML sont disposées de façon concentrique.

De plus la constitution de la média permet de classifier les différentes artères en trois groupes. On distingue :

- Les artères élastiques qui sont de gros calibre et proches du cœur, comme l'aorte ; elles possèdent une média riche en fibre élastiques qui assure des propriétés de compliance,
- Les artères de transition entre les artères élastiques et musculaires,
- Les artères musculaires qui sont loin du cœur, de petit ou moyen calibre ; elles sont les plus nombreuses, et possèdent une média pauvre en fibre élastiques. La couche de cellules musculaires lisses assure des propriétés vasomotrices.

I.1.c. Adventice

L'adventice est la tunique externe ; elle est constituée de tissu conjonctif peu organisé. Elle est riche en collagène et en fibres élastiques et contient des fibroblastes et des adipocytes. L'adventice est irriguée par des *vasa vasorum* et innervée par des *nervi vasorum*. Elle comprend aussi une enveloppe qui permet l'ancrage de l'artère aux structures voisines. Elle repose sur la limitante élastique externe (LEE), composée d'une lame d'élastine, qui la sépare de la média.

I.2. Les cellules musculaires lisses (CML)

I.2.a. Structure

Les CML (figures 49 et 50) ou léiomyocytes sont en forme de fuseau et ont une taille très variable, de 20 à 500µm. Cette cellule possède un noyau unique

allongé ou elliptique au centre de la cellule, et le cytoplasme forme une zone bien définie qui

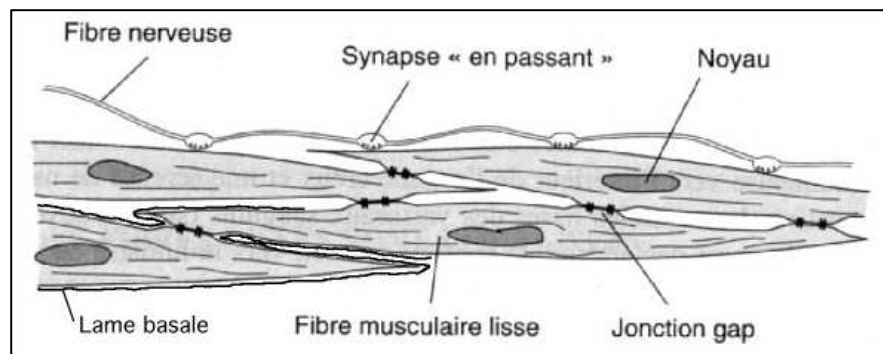


Figure 49 : structure d'une cellule musculaire lisse

coiffe les 2 pôles du noyau qui contient les organites de la cellule. Le reste de la cellule contient le sarcoplasme et des myofilaments.

Les myofilaments sont de deux types : des myofilaments fins d'actine et des myofilaments épais de myosine qui sont groupés en faisceaux irréguliers orientés selon le grand axe de la cellule. Ces derniers sont associés à des molécules de tropomyosine. Les myofilaments d'actine et de myosine sont attachées à des zones denses du sarcoplasme constituées d'alpha-actinine. Des filaments intermédiaires constitués de desmine et de vimentine sont aussi attachés à ces zones denses.

Dans la membrane plasmique on trouve des jonctions communicantes. Entre deux de ces jonctions le sarcolemme possède des plaques d'adhérence en alternance avec des zones riches en cavéoles. Chaque CML est entourée d'une lame basale externe.

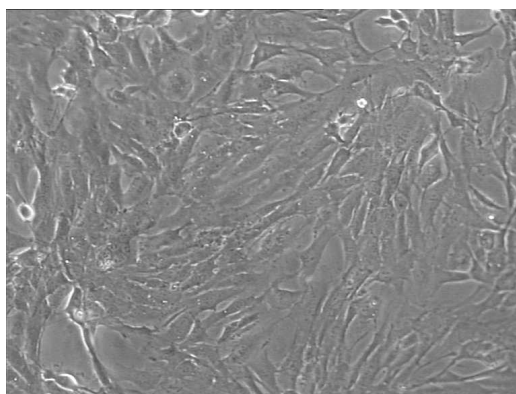


Figure 50 : observation d'un tapis de cellules musculaires lisses en microscopie électronique à contraste de phase

I.2.b. Propriétés

Les cellules musculaires lisses matures sont incapables de migrer. Elles possèdent une faible capacité de prolifération et sécrètent une faible quantité de matrice extra-cellulaire. Cependant, à l'opposé des cellules matures, les cellules musculaires qui interviennent lors d'un remodelage ou lors de la formation du système vasculaire subissent un changement phénotypique qui leur confère un avantage évolutif typique. Ce changement caractéristique est une propriété essentielle de leur programme de différenciation, montrant une certaine plasticité (figure 51). On peut ainsi observer un large spectre de phénotypes en réponse à différents stimuli physiologiques ou pathologiques.

Cette hétérogénéité d'états phénotypiques ne possède pas de marqueurs distincts. Ces derniers apparaissent de façon progressive grâce à des mécanismes d'induction pour former un appareil contractile efficace. Il est donc important de définir les différentes protéines qui caractérisent un état défini. Il existe par conséquent des marqueurs différents pour les CML matures et une lignée cellulaire utilisée pour la culture cellulaire.

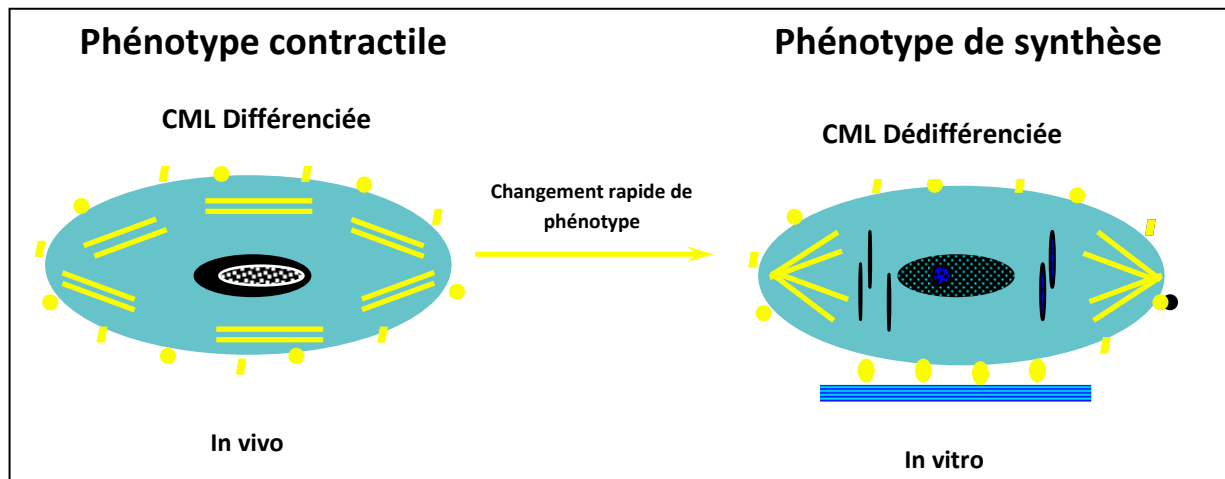


Figure 51 : représentation de CML de phénotype différencié (contractile) et dédifférencié (de synthèse).

En résumé, l'identification des CML s'effectue sur plusieurs critères : les marqueurs spécifiques que nous détaillons par la suite, leur morphologie et leurs caractéristiques fonctionnelles.

I.2.c. Marqueurs de différenciation

Les marqueurs qui caractérisent les CML sont nombreux et de deux types : les protéines de l'appareil contractile et les filaments intermédiaires.

➤ Les protéines de l'appareil contractile

Les protéines de l'appareil contractile sont elles-mêmes constituées de deux types de filaments : les filaments fins et les filaments lourds.

Les filaments fins sont les suivants :

- L' α -actine de muscle lisse, protéine de 42kDa, est le premier marqueur de différenciation identifié. Il existe 5 autres isoformes de l'actine (Vandekerckhove *et al.*, 1978) mais, dans les CML vasculaires différenciées et matures, la forme la plus abondante est l' α -actine avec plus de 40% des protéines totales et plus de 70 % de l'actine totale. De plus pour une bonne contraction la cellule doit nécessairement contenir un fort pourcentage d' α -actine.
- La caldesmone est un marqueur exprimé dans les cellules matures et immatures mais également dans des tissus non musculaires (Ueki *et al.*, 1987). Du fait de son absence de spécificité, il n'est pas utilisé dans la caractérisation des CML. Son fonctionnement se réalise via une liaison avec l'actine et la calmoduline.
- La calponine est fortement liée à l'actine mais son mécanisme d'action réel n'est pas clairement établi. Il a seulement été prouvé que cette protéine de 28 à 34 kDa agissait de manière calcium-dépendante (Winder *et al.*, 1992).
- La smootheline est un marqueur tardif de différenciation des CML (Van der Loop *et al.*, 1996). Cette protéine de 100 kDa est une protéine structurale associée aux filaments d'actine. Son expression est rapidement réprimée lors de la mise en culture, il est donc impossible de caractériser les CML par ce marqueur.
- La « SM22 α » est une protéine de 22 kDa comme l'indique son nom. Elle est mal identifiée. Elle est présente principalement chez les CML mais on peut aussi la trouver dans les fibroblastes et les myofibroblastes (Chiavegato *et al.*, 1999)

Les filaments lourds quant à eux sont constitués exclusivement par de la myosine et ses deux types de chaînes : la chaîne lourde et la chaîne légère. La chaîne légère sous sa forme phosphorylée induit un changement de conformation de la myosine dans un état capable de se lier à l'actine. La chaîne lourde est exprimée sous deux formes dans la CML : SM-1 et SM-2. La forme deux est un marqueur de différenciation avancé des CML (Babij *et al.*, 1992). Son rôle principal de contraction est assuré par sa fonction ATPasique.

➤ Les filaments intermédiaires

Ils sont représentés par la desmine et la vimentine. La proportion de ces deux types de filaments varie entre les CML d'un même vaisseau (Gabbiani *et al.*, 1981). Leur rôle consiste en un maintien de la morphologie cellulaire et de la cohésion intercellulaire, mais également dans la résistance au stress mécanique.

II. Les biomatériaux

II.1. Définition

La conférence de consensus de Chester de la Société Européenne des biomatériaux a défini les biomatériaux en 1986 de la manière suivante : « matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destinés à interagir avec les systèmes biologiques ». Cependant cette définition a été modifiée en 1991 pour présenter les biomatériaux comme des « matériaux utilisés pour interagir avec les systèmes biologiques dans le but d'évaluer, traiter, augmenter ou remplacer tout tissu, organe ou fonction de l'organisme ».

Pour qu'un biomatériau soit « idéal », il doit posséder de nombreuses propriétés telles que la biocompatibilité, la biofonctionnalité, la biodégradabilité, l'inertie, la non-immunogénicité et la stérilisabilité. En effet ces matériaux doivent avoir la capacité d'être utilisés dans des applications spécifiques d'interaction chez un être vivant (humain) avec une réponse appropriée de l'hôte et de maintenir cette capacité dans le temps.

II.2. Alginate

La structure de ce produit, ainsi que ces propriétés physico-chimiques ont déjà été développé dans la partie des alginates. Nous ne les redétaillerons donc pas ici.

II.3. Les films multicouche de polyélectrolytes

Dans les années 1990 Decher *et al.* découvrent les films multicouche de polyélectrolytes. Cette technique alors innovante permet la formation de minces films de polymères hydrophiles. Cette construction est réalisée par le dépôt de couches successives de chaînes de polyélectrolytes sur une surface chargée (figure 52). L'épaisseur du dépôt est variable mais sa mesure varie du nanomètre à plusieurs dizaines de nanomètres. Les couches successives résultent d'une adsorption alternée de polycations et de polyanions et constituent un film très hydraté.

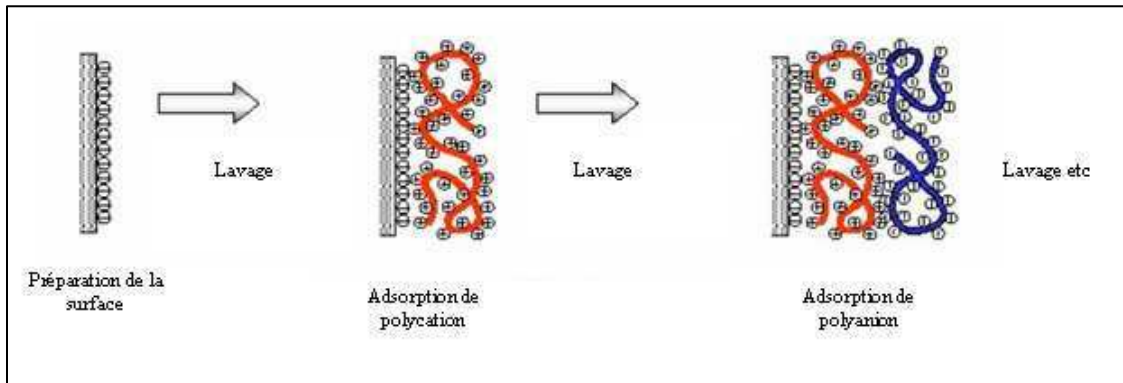


Figure 52 : principe de la construction d'un film multicouche de polyélectrolytes

Ce type de structure possède une bonne cohésion grâce aux forces électrostatiques qui interagissent entre les différents électrolytes de charges opposées mais également par l'intermédiaire des interactions hydrophobes qui permettent une certaine stabilité du complexe (Kotov *et al.*, 1999). De nombreux polyélectrolytes sont envisageables : poly-D-lysine, polyéthylénimine, poly-L-glutamine, polylysine,..., mais dans notre travail nous avons choisi d'utiliser comme polycation le PAH ou Chlorhydrate de poly(allylamine) et comme polyanion le PSS poly(4-styrène sulfonate de sodium) (figure 53). Dans ce type de film, la masse et l'épaisseur croissent de façon linéaire avec le nombre de couches (Lavalle *et al.*, 2002). Dans les films linéaires, les différentes couches pénètrent peu les unes dans les autres : on obtient alors un film stable, homogène et adhérent grâce aux diverses interactions entre les polyélectrolytes eux-mêmes et avec le substrat.

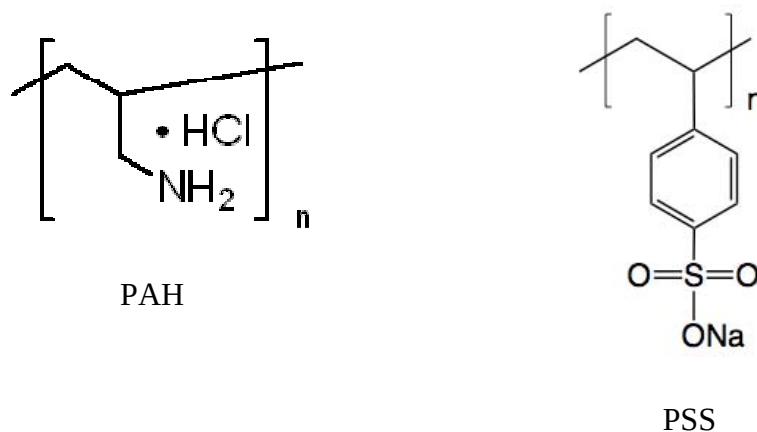


Figure 53 : structure chimique des polyélectrolytes utilisés. PAH: poly (allylamine –hydrochloride); PSS : poly (sodium 4-styrène sulfonate)

Un des avantages des multicouches de polyélectrolytes est la possibilité de modifier leurs propriétés en ajustant certains paramètres comme la nature des polyélectrolytes, la force ionique, le pH ou encore la température. Les propriétés modulables sont entre autres, l'épaisseur, la rugosité, la perméabilité, les propriétés mécaniques ou encore la charge de surface.

Depuis quelques années, ces films sont très étudiés du fait de leurs nombreuses applications. Ils trouvent actuellement une application dans des domaines variés tels que l'optique avec le traitement des verres antireflets, des procédés de séparation et de nanofiltration, la production de microcapsules et nanoparticules,..., mais surtout pour ce qui nous concerne la bioingénierie que nous développerons dans le paragraphe suivant.

III. Ingénierie tissulaire

III.1. Définition

L'ingénierie tissulaire (IT) a pour but de remplacer, maintenir ou améliorer la fonction de tissus humains, grâce à des substituts tissulaires incluant des éléments vivants. Il s'agit donc d'élaborer des tissus artificiels, en faisant appel aux cultures de cellules (cellules différenciées, ou cellules souches), à des biomatériaux, à des facteurs de croissance dans le but d'aboutir à un biomatériau hybride. Cette technique utilise généralement les « scaffolds », c'est-à-dire des matrices qui servent de support à la reconstruction tissulaire.

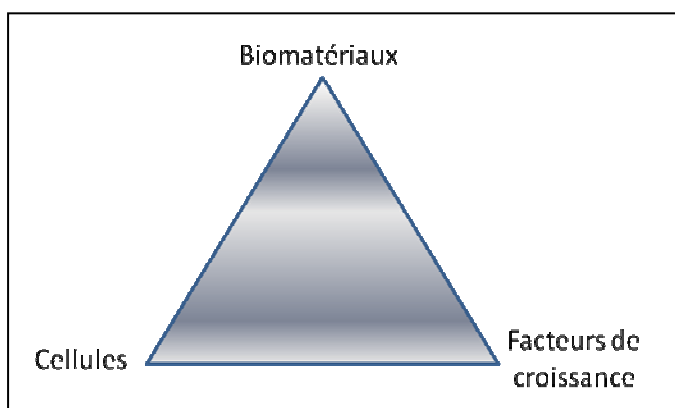


Figure 54 : concept d'ingénierie tissulaire ; l'ingénierie tissulaire est basée sur le triptyque cellules/biomatériaux/facteurs biologiques dans le but de générer un tissu hybride

III.2. Rôle de l'ingénierie tissulaire dans l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie qui conduit à l'obstruction de la lumière des vaisseaux. A l'heure actuelle le traitement de dernier recours reste le remplacement chirurgical du ou des vaisseau lésés. Deux techniques sont possibles : la greffe autologue et la greffe de vaisseaux synthétiques. La greffe autologue

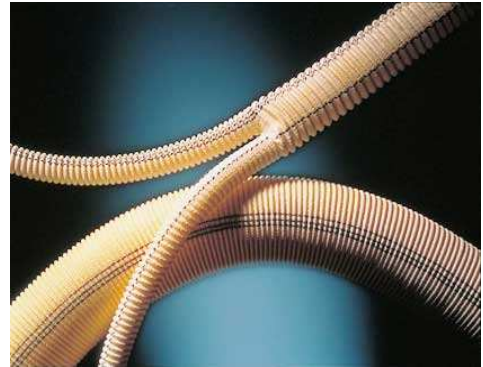


Figure 55 : vaisseaux synthétiques en PTFE

peut se réaliser à partir de veine saphène ou d'artère mammaire interne en raison de leurs caractéristiques structurales ou fonctionnelles proches de celles des vaisseaux lésés. La limite de cette première technique est le manque de greffons disponibles. En effet, 70% de ces greffons ne peuvent pas être utilisés du fait de leur mauvais état ou de leur utilisation pour une intervention précédente. Quant à la greffe de vaisseaux synthétiques, elle utilise des prothèses à base de polytétrafluoroéthylène expansé (PTFE) (figure 55), de polyuréthane ou enfin de polyéthylène téréphtalate (Dacron®). Cette technique possède l'avantage de ne pas recourir à une intervention chirurgicale pour l'obtention du greffon. Cependant les prothèses synthétiques de petit calibre c'est-à-dire inférieur à 6 millimètres, posent des problèmes de resténose du fait de leur surface interne thrombogénique et de leurs faibles propriétés mécaniques.

Par conséquent, il existe un manque cruel de greffons de petit calibre possédant des propriétés mécaniques similaires aux vaisseaux naturels et non thrombogéniques.

L'approche globale de l'ingénierie tissulaire des vaisseaux est basée sur les « scaffolds ». Deux types de scaffolds ont été décrits : de polymères synthétiques type acide polyglycolique (Iwasaki *et al.*, 2008 ; Hoerstrup *et al.*, 2001), poly-L-lysine, polyuréthane (Kim *et al.*, 1998) et des matrices biologiques. Ces dernières sont représentées par trois grandes classes : les vaisseaux sanguins décellularisés allo- ou xénogéniques, des conduits non vasculaires décellularisés et des matrices extracellulaire préfabriquées comme des gels de collagène ou des matrices générées *in vitro* par des fibroblastes ensemencés dans un bioréacteur. Par ailleurs les scaffolds ne doivent pas être cytotoxiques, ni thrombogéniques et immunogènes (Yow *et al.*, 2006).

Ces différents scaffolds vont êtreensemencés avec des CE et CML en condition dynamique dans un bioréacteur mis au point par Niklason *et al.* en 1999.

En 1986, Weinberg *et al.* ont été les premiers à développer cette technique. Le scaffold utilisé était un gel de collagène dans lequel étaient insérés des fibroblastes. Une fois le cylindre réalisé, les autres types cellulaires (CE et CML) sont ajoutés au système afin d'obtenir un vaisseau de petit calibre.

En se basant sur cette technique, L'heureux *et al.* ont développé en 1998 une nouvelle approche de l'ingénierie tissulaire vasculaire appelée « cell sheet » qui consiste à produire les différents feuillets du vaisseau afin de les assembler.

III.2.a. Construction par feuillet cellulaire

La construction des feuillets est délicate puisqu'elle doit permettre leur détachement de la culture cellulaire tout en conservant les interactions cellules-cellules. La difficulté de cette technique consiste à obtenir des cellules ayant une forte cohésion entre elles mais pas avec le substrat. Cependant, si les cellules n'adhèrent pas suffisamment avec le substrat elles ne pousseront pas correctement et ne synthétiseront pas leur matrice. L'intérêt de ce système est par conséquent de récupérer les cellules dans leur ensemble et dans la matrice extracellulaire qu'elles viennent de synthétiser.

Cette technique à fait ses preuves dans les domaines articulaire, ligamentaire, cardiaque,... Mais L'heureux *et al.* sont les premiers à avoir développé cette technique en 1998 dans le cadre de l'ingénierie vasculaire. Leur but est de développer un greffon vasculaire en utilisant du matériel biologique qui servira à créer des « scaffolds ».

Les cellules utilisées sont les CE et des CML de cordon ombilical humain ; quant aux fibroblastes ils sont issus d'un prélèvement de peau humaine. Ces différents types cellulaires sont cultivés pendant 5 semaines et aboutissent à des feuillets cellulaires à cellules confluentes et avec production de matrice extracellulaire (MEC). Les feuillets sont alors enroulés autour d'un mandrin afin de former la media et l'adventice. Ce système est ensuite cultivé 8 semaines dans un bioréacteur adéquat. Au bout de ce temps le mandrin est retiré et le « rouleau » obtenu est endothélialisé avec des CE. Le greffon ainsi obtenu possède de bonnes propriétés mécaniques et de suturabilité.

Ce système a été testé *in vivo* mais un taux de réussite de 50% seulement a été obtenu. La raison de ce faible taux est une infiltration sanguine entre les différents feuillets.

La suite des travaux de ces auteurs, leur a permis d'améliorer leur produit et de développer Lifetime™, un greffon constitué d'un feuillet de CE et d'un de fibroblaste. Ce substitut implanté chez le singe a démontré son efficacité avec un taux de perméabilité à 8 mois de 86% (L'heureux *et al.*, 2006).

Le problème majeur de cette technique est le travail fastidieux et très long nécessaire pour la réalisation d'un seul greffon.

Afin de créer ces différents feuillets plusieurs matrices peuvent être utilisées telles que le collagène, différents polymères,... Nous avons choisi d'utiliser un polymère particulier, l'alginate, qui a déjà montré un intérêt particulier dans le cadre de l'ingénierie tissulaire.

III.2.b. Applications de l'alginate dans l'ingénierie tissulaire

Les gels d'alginate trouvent de nombreuses applications dans l'ingénierie tissulaire. En effet, l'alginate est une substance non toxique, inerte et non immunogène qui présente donc les caractéristiques requises pour constituer un bon « scaffold » pour l'ingénierie tissulaire (Hara *et al.*, 2001).

Plusieurs équipes ont démontré l'intérêt de ce type de biomatériau. L'alginate a été utilisé comme vecteur de délivrance mais aussi comme support de microencapsulation. En effet des billes d'alginate servent de réservoir. Elles constituent un support très bien étudié aujourd'hui puisqu'on sait contrôler leur production et leur reproductibilité au niveau des dimensions. L'alginate en tant que matrice de support de l'encapsulation cellulaire est un outil considérable utilisé dans l'expérimentation animale et les essais cliniques (Leinfelder *et al.*, 2003). De plus ces billes sont biodégradables grâce à une diffusion lente des ions calcium (qui permettent la cohésion du gel) en dehors du gel. *In vivo*, les molécules d'alginate sont excrétées par voie urinaire (Novikov *et al.*, 2002).

L'alginate est également utilisé dans la culture cellulaire d'hépatocytes, de cellules nerveuses mais principalement de chondrocytes. Différentes études ont montré que l'adhésion et la morphologie cellulaires des chondrocytes varient en fonction des propriétés mécaniques des gels qui les supportent (Genes *et al.*, 2004).

Enfin, afin d'améliorer les propriétés biologiques des gels, il est possible de le mélanger avec d'autres biomatériaux. Cette association a notamment été réalisée dans le domaine de l'os par association avec de l'hydroxyapatite. Ce mélange produit un composite ostéoconducteur qui active la prolifération des cellules osseuses et permet de maintenir un phénotype osseux plus longtemps (Tampieri *et al.*, 2005).

Au vu de ces différentes applications, l'alginate semble posséder de nombreuses qualités du biomatériau recherché et il semble donc intéressant d'y recourir pour la création de cell sheet. De plus, il est possible de le fonctionnaliser afin d'améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaire et de parvenir le plus rapidement possible à un feuillet cellulaire. Or les films multicouche de polyelectrolytes ont déjà beaucoup été étudiés et leurs applications dans l'ingénierie tissulaire sont nombreuses (Kerdjoudj *et al.*, 2010).

III.2.c. Applications des films multicouche de polyelectrolytes dans l'ingénierie tissulaire

Plusieurs équipes se sont attachées à démontrer que le verre recouvert avec des films multicouche de polyelectrolytes permet une bonne adhésion cellulaire et un bon comportement des cellules vasculaires matures (CML et CE) (Berthélémy *et al.*, 2008).

De plus certaines ont évalué le comportement des HUVEC sur différents types de films, démontrant ainsi que les films se terminant par une charge positive, c'est-à-dire un polycation, permettent une meilleure adhésion des différents types cellulaires mais également que le film PAH-(PSS-PAH)₃ préservait mieux la forme et l'allongement du cytosquelette. Ce type de film semble donc idéal puisqu'il ne modifie en rien l'expression de certaine molécule d'adhésion comme ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecules-1) (Boura *et al.*, 2006).

D'autres types de coating par des films ont été réalisés. Des essais d'amélioration de l'adhésion des cellules endothéliales dans des substituts synthétiques de type PTFEe ou dacron ont été réalisés (Moby *et al.*, 2007)

Aujourd'hui la recherche s'emploie également à coater des greffons naturels cryopréservés avec ce type de film. Des résultats préliminaires ont montré que ces films

permettaient la formation d'une monocouche endothéliale avec des CE adhérentes par rapport aux greffons non traités (Kerdjoudj *et al.*, 2006 et 2008).

Dans le cadre de nos recherches, nous allons tenter de développer un gel d'alginate qui dans un premier temps servira de matrice pour créer un feuillet de CML (figure 56). Afin d'améliorer le biomatériau choisi, il va être fonctionnalisé par des films multicouche de polyélectrolytes.

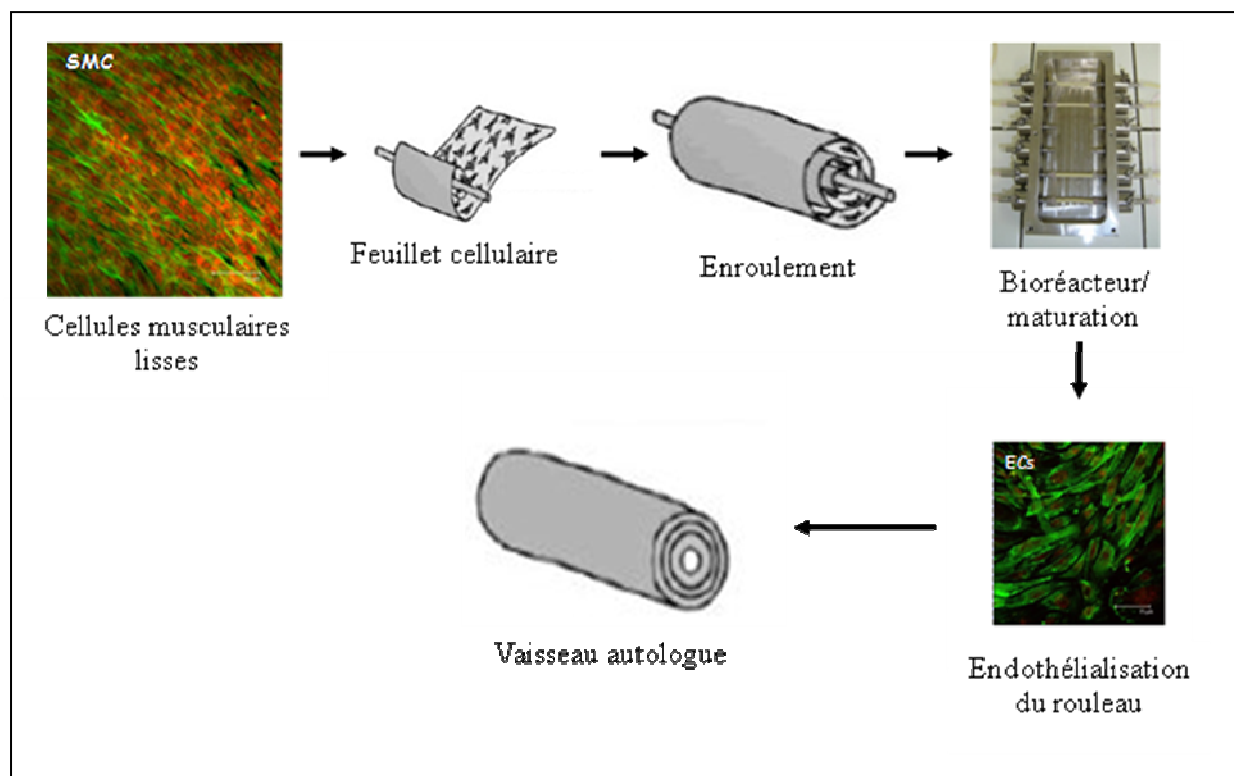


Figure 56 : ingénierie vasculaire : construction par feuillet cellulaire. Les cellules sont cultivées sur un biomatériau fonctionnalisé afin de former un feuillet cellulaire. Puis le feuillet est détaché de son support pour être enroulé autour d'un mandrin. Ce «tube» va ensuite être cultivé dans un bioréacteur. La lumière pourra alors être endothélialisée afin de former un vaisseau autologue

B/ MATERIEL ET METHODES

I. Préparation du biomatériau

I.1. Préparation des lames de verre

Avant de déposer le film multicouche de polyélectrolytes sur les lames de verre il faut faire ressortir la polarité négative due à la silice. Pour cela on procède à deux lavages de 15 min dans un bain de SDS (Sigma, France) 0,01 M dilué dans de l'eau distillée filtrée à 100°C, puis dans un bain de HCl (Sigma, France) 0,12M à 100°C. Après chaque bain trois rinçages sont effectués avec de l'eau distillée filtrée. Les lames sont conservées jusqu'à leur utilisation dans de l'eau distillée filtrée à 4°C.

I.2. Matériel

Les polyélectrolytes utilisés sont :

- Le polycation : chlorhydrate de polyallylamine (PAH) (Sigma Aldrich, France, PM=70kDa)
- Le polyanion : poly (4-styrène sulfonate de sodium) (PSS) (Sigma Aldrich, France, PM=70kDa).

Les polyélectrolytes sont dissous à une concentration de 1 mg/mL dans une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) (Sigma, France) à 7,4 mg/ml. Cette solution est également utilisée pour les lavages.

Les films sont déposés par une technique de spray. Pour cela des flacons vaporisateurs « air-boy® » (Carl Roth, France) (figure 57) sont utilisées. La lame est déposée sur un support réalisé par le laboratoire de Strasbourg par l'équipe de Mr Voegel.

Deux types d'alginate de sodium sont utilisés : à viscosité faible (ALV : Alginate Low Viscosity) et moyenne viscosité (AMV : Alginate Medium Viscosity) (Sigma, France). Ces deux polymères sont dissout dans de l'eau miliQ à une concentration de 1%, soit 1g pour 100 mL.



Figure 57 : flacon pulvérisateur "air-boy"

I.3. Protocole

Les flacons « air-boy » sont remplies au maximum avec les solutions réalisées. Un maximum d'air y est introduit afin d'obtenir un spray bien diffus et en fines gouttelettes.

Les solutions sont pulvérisées les unes à la suite des autres, sur la lame de verre à une distance de 5 cm.

Les temps de pulvérisation varient selon la solution :

- 30 secondes pour les couches d'alginate ;
- 5 secondes pour les couches de chlorure de calcium ;
- 15 secondes pour les solutions de polyélectrolytes.

La lame de verre est ensuite retirée du support pour être placée dans une boîte de pétri. Les cellules sont alorsensemencées sur ce support à une densité de 1 000 000 cellules. Elles sont déposées sur le biomatériau, puis on ajoute par dessus la quantité de milieu nécessaire afin de ne recouvrir que la lame. Au bout de 4 heures d'incubation à 37°C , du milieu de culture est ajouté pour atteindre 10 mL. Les cellules sont laissées en culture jusqu'à confluence.

I.4. Enroulement du gel

L'enroulement se réalise autour d'une barre en téflon de diamètre 6 mm qui va servir de mandrin (figure 58). Le téflon est utilisé en raison de sa non adhérence mais également de sa possibilité d'autoclavage.

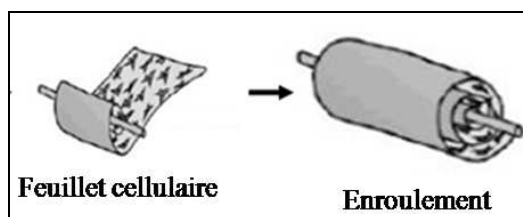


Figure 58 : technique d'enroulement du feuillet cellulaire

La structure d'alginate est décollée de la lame de verre puis progressivement enroulée autour du mandrin. Une fois l'enroulement effectué, la barre de téflon est retirée délicatement et le « rouleau » est placé dans une boîte de pétri disposée verticalement.

II. Méthode de caractérisation du biomatériau

II.1. Microscopie confocale a balayage laser

Le microscope utilisé au laboratoire est un Leica TCS SP2-AOBS (Leica microsystems, Allemagne).

La microscopie confocale à balayage laser permet de visualiser des tissus en trois dimensions et marqués par des molécules fluorescentes.

Le microscope confocal est basé sur le principe de la fluorescence, la lampe à lumière blanche étant remplacée par un laser. Le laser est focalisé sur la préparation et seule la zone de focalisation est suffisamment excitée pour émettre de la fluorescence, le reste de la préparation restant sombre. En balayant avec le laser tout le plan de focalisation, on obtient une image très nette.

Le laser excite les fluorochromes en des points précis de l'échantillon. Le signal émis en chaque point est récupéré sur un photomultiplicateur. Un diaphragme, qui arrête tout signal ne provenant pas du plan focal, est placé devant le photomultiplicateur. Le signal reçu y est amplifié puis numérisé. L'image est construite point par point par balayage du champ analysé à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse.

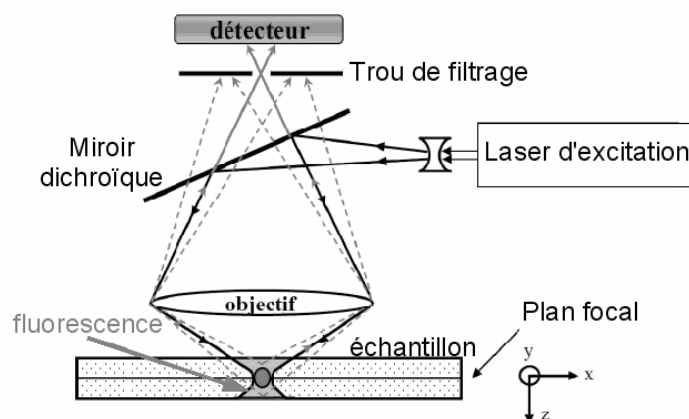


Figure 59 : principe de fonctionnement du microscope confocal

II.2. Mesure de la viscosité des solutions d'alginate

II.2.a. Principe de fonctionnement

Le viscosimètre Low-shear 30 (Contraves, Suisse) est un rhéomètre rotatif basé sur le principe de Couette. Il est constitué de deux cylindres coaxiaux :

- Un cylindre extérieur entraîné par un moteur à vitesse de rotation réglée. Ce cylindre recueille la substance à étudier.
- Un cylindre intérieur fixe relié à un système de mesure qui transforme la force mécanique en force électromagnétique.

La substance à étudier joue le rôle d'interface entre les deux cylindres. La mesure du couple nécessaire pour empêcher la rotation du cylindre intérieur sous l'effet de la viscosité de la substance permet de remonter à la valeur de la viscosité.

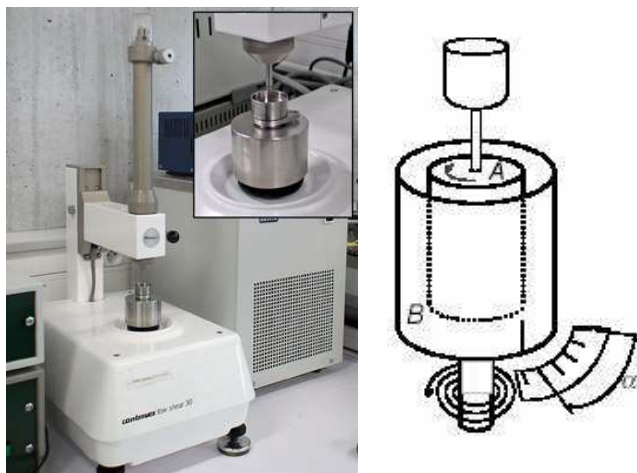


Figure 60 : viscosimètre Low shear 30 et principe de Couette

II.2.b. Protocole

La température de travail est extrêmement importante pour la mesure de viscosité. Il est donc nécessaire de la connaître avec précision. Pour cela de l'eau distillée ainsi qu'un thermomètre sont placés dans le cylindre interne jusqu'à l'équilibre de la température.

Ensuite l'appareil est mis en route à vitesse de cisaillement nulle et le cylindre interne est séché pour régler le zéro.

La viscosité de l'eau distillée est une valeur connue aux différentes températures. Un contrôle est donc effectué.

Le viscosimètre cisaille de $128,5 \text{ s}^{-1}$ à $0,01747 \text{ s}^{-1}$. Les différentes vitesses de cisaillement sont parcourues afin d'obtenir les premières valeurs numériques à partir desquelles on va en déduire la viscosité. Ces valeurs doivent être comprises entre 10 et 90 afin d'être le plus précis possible.

Ces valeurs obtenues sont alors transformées en viscosité en mPa.s grâce aux abaques.

C/ RESULTATS

I. Mise au point de l'architecture à base du gel d'alginate et de films multicouches de polyélectrolytes

Le travail effectué lors de cette première phase a consisté en la détermination des bonnes conditions expérimentales afin d'élaborer une membrane détachable à base de gel d'alginate.

I.1. Formation d'un gel d'alginate à la surface d'une lame de verre

Le but ici est d'obtenir une membrane d'alginate homogène. Deux techniques de dépôt ont pu être testées:

- La première a consisté à déposer manuellement, à l'aide d'une pipette, une solution d'alginate sur une lame de verre. Le gel d'alginate est ensuite obtenu par trempage de cette dernière dans une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) pour permettre la gélification de l'alginate.

- La deuxième méthode est basée sur la technique du « spray » ou pulvérisation, où l'alginate est pulvérisé à l'aide des bouteilles « Air-Boy[®] », directement sur la lame de verre. L'orientation verticale de cette dernière permet un drainage naturel de la solution d'alginate. De la même manière, la solution de CaCl_2 est pulvérisée sur la lame de verre afin d'obtenir un gel d'alginate.

Il est important de signaler que l'alginate étant un polymère négatif, il est impératif d'avoir une surface positive pour permettre l'adhésion du gel. Pour cela, nous avons adsorbé une couche de PAH, un polyélectrolyte chargé positivement, à la surface de la lame de verre chargée négativement à la base.

D'après les résultats obtenus, nous avons observé que le dépôt par l'approche du « spray » permet d'obtenir un gel fin et d'apparence homogène et plan. Au contraire, lorsque le gel est déposé suivant la première méthode, celui-ci présente des irrégularités à sa surface facilement visualisables à l'œil nu. Le gel est également beaucoup plus épais.

Par conséquent, toutes nos constructions ont été réalisées par la méthode de « spray ».

I.2. Elaboration d'une membrane de gel d'alginate détachable

I.2.a. Gels simples

Nous avons choisi de comparer deux types d'alginate :

- L'alginate de basse viscosité ou alginate low viscosity (ALV).
- L'alginate de moyenne viscosité ou alginate medium viscosity (AMV).

Nous avons observé que le gel d'alginate obtenu par une solution d'ALV est très fin, facilement cassable et ne se décolle pas aisément de la lame de verre.

L'AMV permet d'obtenir une membrane de gel d'alginate qui se détache convenablement du support à condition que le gel soit suffisamment épais (figure 61).

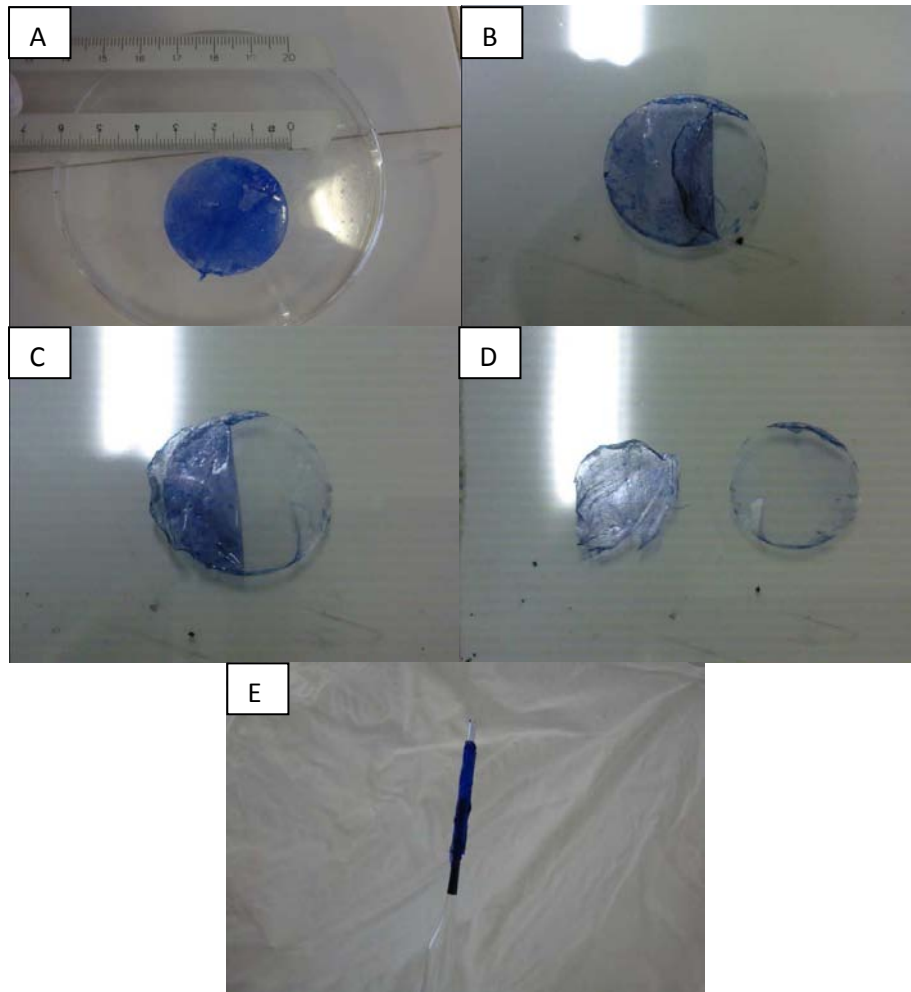


Figure 61 : dépôt d'un gel d'alginate de viscosité moyenne coloré au bleu de trypan sur lame de verre (A). Le gel est ensuite décollé progressivement de son support (B, C, D) puis enroulé autour d'un mandrin de verre (E).

I.1.a. Gels stratifiés

Notre but est d'obtenir une membrane d'alginate qui soit fine et facilement détachable. Pour cela, nous avons opté pour une architecture stratifiée où deux gels d'alginate seront superposés.

Les superpositions testées sont les suivantes :

- AMV sur AMV,
- AMV sur ALV.

Nous avons montré la superposition de deux gels d'alginate n'est possible que lorsqu'une couche de PAH est adsorbée à la surface du premier gel.

La superposition AMV sur AMV conduit au décollement des deux couches du support. Cependant, la superposition AMV sur ALV a permis le détachement d'une membrane d'alginate composé d'AMV. En effet, le gel d'ALV reste collé à la lame de verre. Cette

deuxième architecture semble donc plus satisfaisante car on obtient une seule membrane moins épaisse et plus facilement enroulable.

I.3. Elaboration de l'architecture stratifiée à base de gel d'alginate et de films multicouches de polyélectrolytes

Nous avons réalisé l'architecture suivante (figure 62) :

- 1 : FMPE (films multicouche de polyélectrolytes)
- 2 : ALV
- 3 : FMPE
- 4 : AMV
- 5 : FMPE

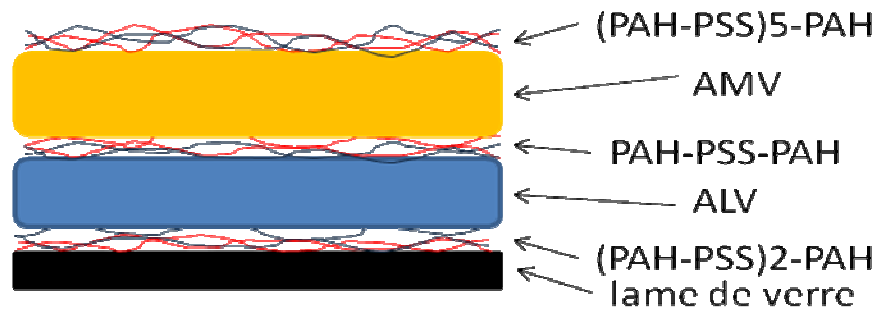


Figure 62 : architecture finale développée : sur la lame de verre sont déposés 2 bicouches et demi de polyélectrolytes. Un gel d'alginate de basse viscosité est ensuite déposé. Puis 1 bicouche et demi des mêmes polyélectrolytes est ensuite déposé. La deuxième couche d'alginate de viscosité moyenne est ensuite déposée puis recouverte d'un film multicouche de polyélectrolytes composés de 5 bicouches et demi.

I.3.a. Visualisation de l'architecture en microscopie optique : topographie

Nous avons constaté grâce au microscope optique à contraste de phase (figure 63 A) que le gel présente une porosité importante à sa surface. Lorsque la gélification est réalisée par pulvérisation de la solution de CaCl_2 directement au-dessus, la surface du gel est régulière et caractérisée par des stries distantes de quelque micromètres (figure 64).

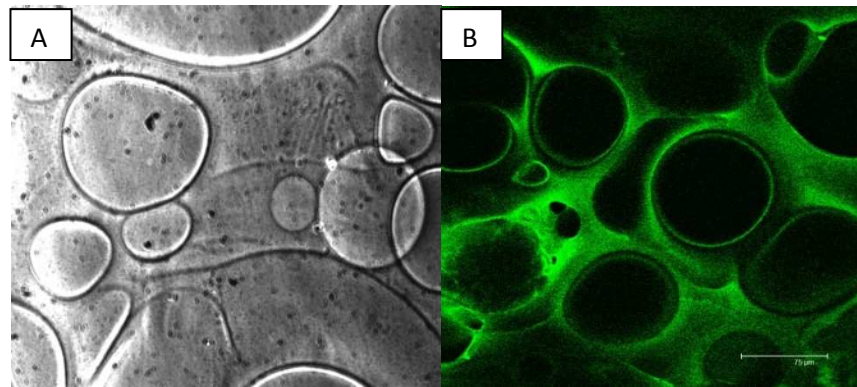


Figure 63 : aspect de la surface du gel observé au microscope à contraste de phase (objectif x40) (A) et au microscope confocal (B) après avoir recouvert le gel d'alginate d'un film de PAH marqué à la FITC (objectif x40).

La microscopie confocale a également permis de confirmer la topographie poreuse du gel d'alginate lorsque la gélification est réalisée par pulvérisation de la solution de CaCl_2 directement sur le gel (figure 63 B).

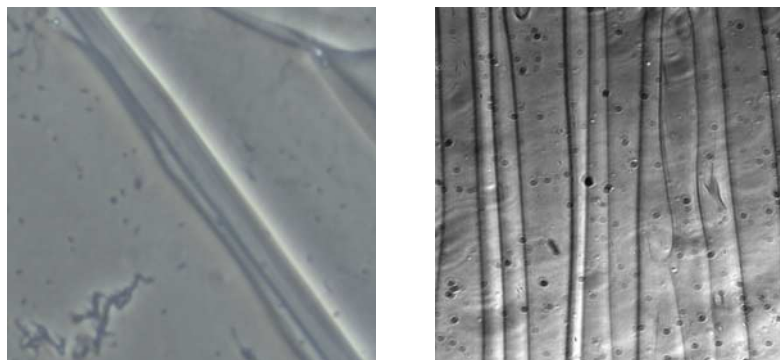


Figure 64 : observation au microscope à contraste de phase (objectif x40) des stries réalisées dans le gel d'alginate à la suite de la modification de la technique de pulvérisation

I.3.b. Epaisseur de l'architecture stratifiée

Pour estimer l'épaisseur de notre architecture, nous avons utilisé le PAH marqué à la FITC. L'architecture visualisée est la suivante :

- PAH (FITC)
- AMV / ALV
- PAH (FITC)

Le résultat a montré que lorsque le temps de pulvérisation est de 30 secondes, que ce soit dans le cas de l'ALV ou de l'AMV, nous obtenons une épaisseur totale d'environ 50µm (figure 65).

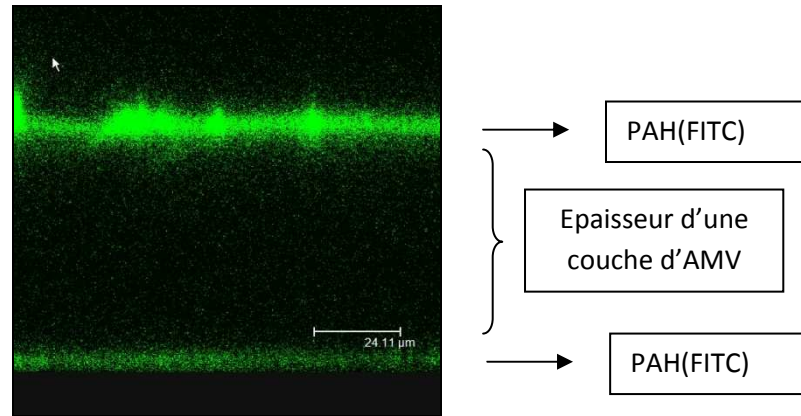


Figure 65 : mesure de l'épaisseur de gel d'alginate de viscosité moyenne (AMV), selon le repère xzy. Sur la lame de verre, une couche de PAH marqué à la FITC est déposée puis le gel d'alginate est pulvérisé sur cette couche. Enfin une couche de PAH marqué à la FITC recouvre ensuite le gel. Microscope confocal à balayage laser, ouverture numérique = 0,8(SP2, AOBS, Leica Allemagne); barre échelle = 75 µm, objectif x40.

I.4. Enroulement du gel d'alginate

La finalité de cette construction est d'obtenir un tube (cellularisé) de forme proche de celle du vaisseau sanguin. Pour cela, l'alginate est d'abord détaché du support puis enroulé autour d'un mandrin en téflon (figure 66).

Le gel d'alginate une fois enroulé peut donc être retiré du mandrin et mis dans une solution de CaCl_2 où il reste enroulé.

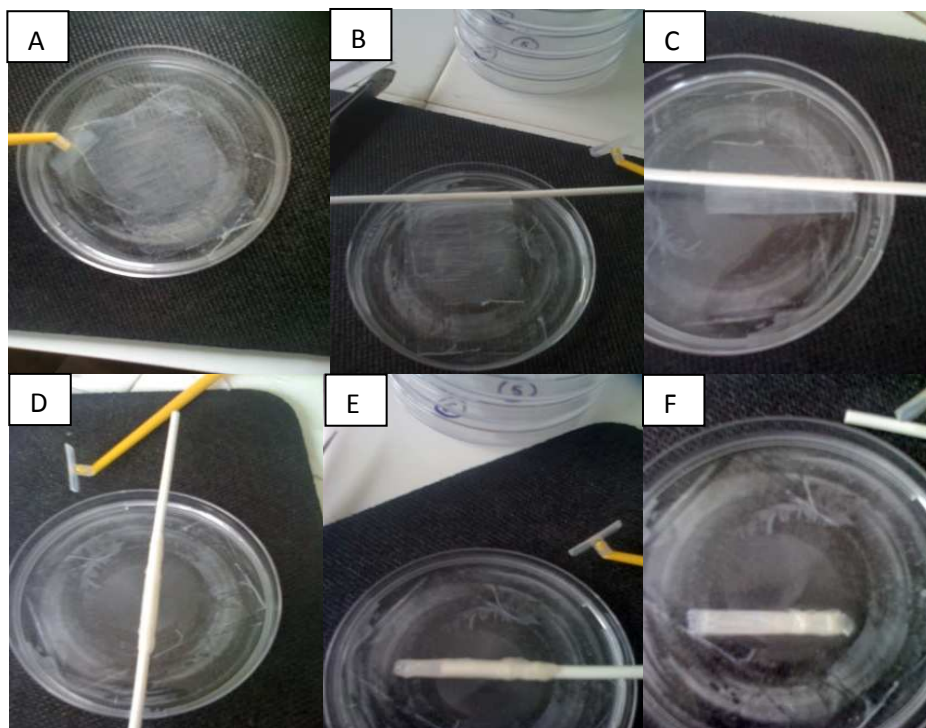


Figure 66 : enroulement du biomatériau final non cellularisé. Le gel est d'abord décollé de la lame de verre (A) puis enroulé autour d'un mandrin en téflon (B, C). Une fois enroulé (D) le tube est retiré du mandrin en téflon (E). Le tube reste en forme une fois le mandrin retiré (F).

I.5. Quelques tests mécaniques préliminaires sur le rouleau du gel d'alginate

Des essais mécaniques purement qualitatifs ont été réalisés sur le biomatériau développé afin de valider dans un premier temps sa résistance à différentes tensions : la pression, la torsion et l'étirement.

Le tube d'alginate a été soumis à un flux de CaCl_2 (pression) appliqué à l'aide d'une seringue : ce dernier ne s'est pas rompu et apparaît étanche (figure 67 A,B).

Les mouvements de torsions appliqués au gel ne provoquent pas sa déformation mais ce dernier revient à son état initial à la fin de la torsion (figure 67 C).

Ce n'est que lorsque le tube d'alginate est soumis à un très fort étirement sur ses extrémités, que la rupture s'opère au niveau des ligatures et non au centre, ce qui prouve sa relative solidité (figure 67 D).

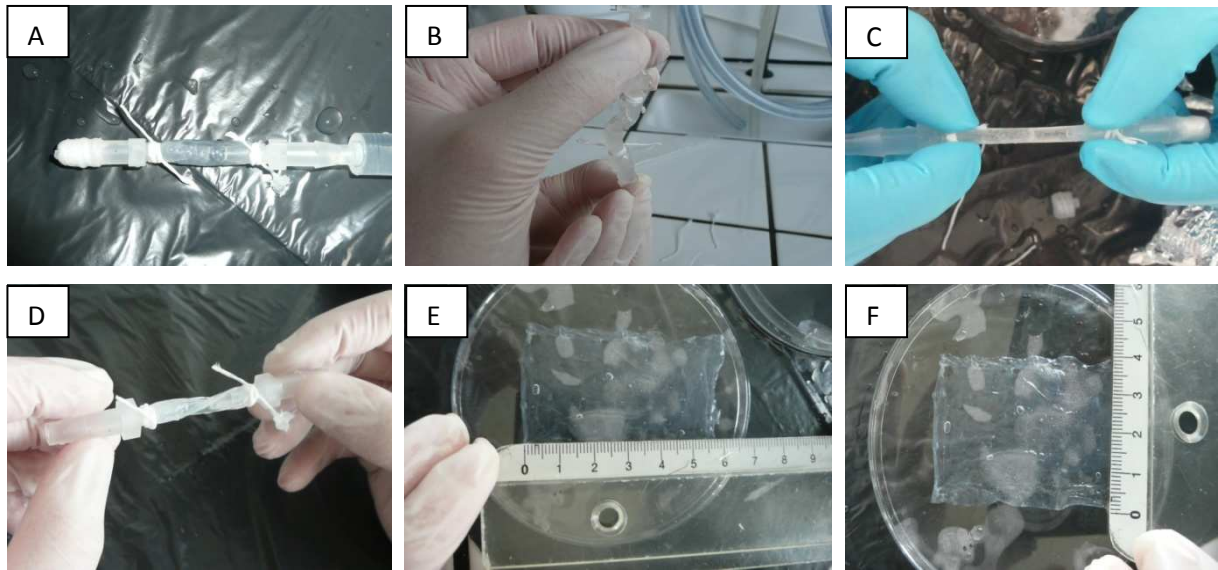


Figure 67 : réalisation de tests mécaniques succincts : les tests de pression envoient de l'eau dans le rouleau à l'aide d'une seringue fixée en bout du tube afin d'observer la déformabilité du tube (A, B). Le deuxième test consiste à tirer sur les deux bouts du tube afin d'observer sa résistance à l'étirement (C). Enfin des tests de torsion ont été réalisés : le tube est tordu de 180°C puis le gel revient à sa forme initiale (D). Après les différents tests effectués, le biomatériau est déroulé pour observer son état : le gel a un aspect froissé mais sa taille est relativement inchangée (E, F).

II. Suite du travail

La première étape de la suite consistera à étudier la viabilité cellulaire sur ce biomatériau. Pour ce faire, des cellules musculaires lisses vont êtreensemencées sur ce support et des test d'Alamar Blue® vont être effectués. La culture cellulaire et le test de viabilité ont déjà été mis au point et sont décrits respectivement en annexes 2 et 3.

Sur ce même support il sera essentiel de vérifier que les cellulesensemencées sont bien adhérentes et ne se différencient pas. Un immunomarquage fluorescent sera effectué sur ces cellules (protocole détaillé en annexe 4) :

- l'adhésion cellulaire sera vérifiée grâce au cytosquelette,
- les caractéristiques phénotypiques seront vérifiées grâce aux marqueurs de différenciation que sont : l' α -actine, la myosine (MHC : myosine heavy chain), la calponine.

L'alginate interagit avec le milieu de culture. Les ions sodium contenus dans le milieu s'échangent avec le calcium, provoquant ainsi une liquéfaction du gel. Les différentes solutions proposées pour remédier à cet inconvénient sont les suivantes :

- 1) Epaisseur du gel : d'après la littérature, plus le gel est épais, plus la réticulation en profondeur est médiocre et donc moins le gel est rigide et solide.
- 2) Ajout de calcium dans le milieu : l'ajout de calcium dans le milieu permet de réduire le phénomène de relargage de calcium par le biomatériau et par conséquent de rigidifier le support.
- 3) Modification du nombre de couches de polyélectrolytes.
L'augmentation du nombre de couches de polyélectrolytes très rigide, à la surface de ce biomatériau, pourrait augmenter la résistance de ce gel.

D/ DISCUSSION - PERSPECTIVES

I. Discussion

L'ingénierie vasculaire tend à reconstruire *in vitro* un greffon vasculaire autologue présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles se rapprochant de celles d'un vaisseau natif.

Deux approches en ingénierie tissulaire ont été développées dans la littérature. La première consiste à associer un biomatériau polymérique biodégradable, d'origine synthétique ou naturelle, et des cellules. La deuxième approche est basée sur l'élaboration de feuillets cellulaires qui vont être assemblés puis enroulés pour mimer les différentes tuniques d'un vaisseau natif. La maturation de ce système se réalisera sous flux pour mimer les conditions physiologiques de la circulation sanguine. Ces approches présentent des limites dont la principale reste le temps nécessaire à la réalisation de ce substitut (plus de 3 mois) incompatible avec le caractère d'urgence de cette situation.

Le travail que j'ai réalisé s'inscrit dans le domaine de l'ingénierie vasculaire. Le but était le développement d'une membrane d'alginate, facilement détachable du substrat et enroulable autour d'un mandrin. La fabrication de ce tube est l'étape initiale vers la constitution *in vitro* d'un substitut vasculaire cellularisé. Ce travail peut être considéré comme une étude pilote du laboratoire.

Cette étude consiste à optimiser les conditions afin d'obtenir une membrane d'alginate, détachable et enroulable sous forme de tube.

L'alginate est un polysaccharide qui a la propriété de former un gel au contact d'un cation bivalent. Il présente divers avantages, ce qui explique les nombreuses applications dans le domaine biomédical. Pour cela, l'alginate constitue le biomatériau de choix (Hara *et al.*, 2001).

Dans ce travail, nous avons pu montrer qu'il était possible d'obtenir un gel d'alginate homogène et de meilleure qualité grâce à la technique de pulvérisation, en comparaison à la technique de dépôt où le gel présentait des irrégularités de surface. En effet, nous avons montré que la pulvérisation et le positionnement vertical du support permettaient un drainage naturel au cours de la construction.

Cependant le détachement est difficile et induirait des dégâts cellulaires. Nous avons cherché à construire une structure qui allie les avantages de deux types de gel : ALV et AMV.

Nous avons également pu voir que la stratégie de superposer deux gels d'alginate de type alginate de faible viscosité et alginate de moyenne viscosité est la plus satisfaisante pour détacher avec aisance la membrane d'alginate de viscosité moyenne. En mesurant l'épaisseur totale (100 μm : 50 μm par couche) de cette architecture stratifiée par microscopie confocale, nous avons montré que l'alginate de faible viscosité donne un gel très fin et facilement cassable alors que la membrane d'alginate une fois décollée de son substrat a pu être enroulée autour d'un mandrin en téflon.

Le tube d'alginate obtenu semble répondre à nos attentes car il paraît stable. Nous avons appliqué à ce tube des tests manuels servant de première appréciation qualitative de sa résistance. Nous avons constaté que le gel d'alginate résiste convenablement à un étirement et a une pression exercée par la perfusion d'une solution de CaCl_2 . D'ailleurs, le tube d'alginate retrouve sa forme initiale à la fin des tests, ce qui signifie une bonne "souplesse".

Concernant la topographie de surface du gel d'alginate, nous avons constaté qu'il était possible de la contrôler simplement en changeant la manière de pulvériser la solution de CaCl_2 . En effet, lorsque la solution de CaCl_2 est pulvérisée directement sur le gel, nous obtenons un gel avec une surface poreuse et des invaginations. Par contre, nous avons montré que lorsque la solution de CaCl_2 est pulvérisée au dessus du support, la surface du gel présentait des stries distribuées de façon homogène. Ces stries régulières devraient jouer un rôle très important pour obtenir des cellules orientées dans la même direction. Ce phénomène est une gageure car d'importance majeure en l'ingénierie tissulaire : c'est le "patterning". En effet il faut dire que pour orienter les cellules, il faut exercer un champ magnétique ou autre. Par notre procédé, les CML s'orientent naturellement, donc ce phénomène est très intéressant.

Le gel d'alginate seul ne permet pas ou très faiblement l'adhésion cellulaire (Augst *et al.*, 2006). Pour y remédier, plusieurs études ont montré que la fonctionnalisation du gel d'alginate par des protéines d'adhésion telle que RGD a permis une nette amélioration de l'adhésion cellulaire (Genes *et al.*, 2004).

Les films multicouches de polyélectrolytes constituent une nouvelle alternative pour fonctionnaliser de manière simple des surfaces de biomatériaux (Moby *et al.*, 2007). Dans notre laboratoire, plusieurs travaux ont montré le potentiel des films multicouches. L'adhésion

et la prolifération des cellules matures sont augmentées en présence de ces films (Boura *et al.*, 2006), et le temps de différenciation des cellules souches est réduit (Berthélémy *et al.*, 2008).

Dans ce travail, nous avons opté pour une fonctionnalisation de la surface du gel d'alginate par des films multicouches de polyélectrolytes de type (PAH-PSS)_n (n représente le nombre de couches) afin d'optimiser l'adhésion cellulaire. Le gel d'alginate étant chargé négativement, nous avons choisi de commencer la construction des films multicouches sur le gel par l'adsorption de PAH.

Les premiers résultats de cette mise au point ont permis de développer un biomatériau possédant les propriétés recherchées : membrane détachable, enroulable, résistante et fonctionnalisée pour améliorer la prolifération cellulaire. La faisabilité du concept a donc bien été prouvée.

L'architecture d'alginate ainsi développée se révèle un support d'intérêt et dont la mise au point doit être approfondie.

Enfin, nous avons montré que l'alginate permettrait un décollement des cellules et un enroulement du feuillet. L'avantage de ce type de support comparé à L'heureux *et al.* en 2006, est que les cellules sont décrochées avec le support qui est lui-même enroulé. Le support étant directement enroulé, il évite de traumatiser les cellules lors du décollement du tapis afin de les enrouler. Ce support biodégradable devra donc progressivement être remplacé par la matrice sécrétée par les CML.

L'enroulement du feuillet permet de faire plusieurs couches de cellules enroulées les unes au dessus des autres. Cette structure multicouche de cellules, devrait aboutir à une structure équivalente à la média de structure résistante et possédant plusieurs couches cellulaires concentriques.

II. Perspectives

Le but de ce travail était de proposer un protocole susceptible de permettre la fabrication d'un substitut vasculaire cellularisé et autologue. Cependant, nos résultats requièrent des améliorations de sa mise en œuvre.

A court terme, le support devra être ensemencé pour obtenir un feuillet cellulaire le plus rapidement possible sur ce support stable. Ce feuillet cellulaire devra être caractérisé : les cellules devront garder leur phénotype et produire leur matrice extracellulaire afin de stabiliser définitivement le gel obtenu. Cette production de matrice extracellulaire devra être quantifiée.

Une fois le feuillet réalisé, il devra être enroulé et le comportement des cellules enrobées dans la matrice sera alors étudié. L'étape suivante sera l'endothélialisation de la lumière de ce substitut, technique mieux maîtrisée au laboratoire.

Lorsque le protocole sera arrêté, l'étude sera renouvelée avec des cellules souches du patient dans le but de fabriquer un substitut autologue et éviter tout problème de rejet lors de l'implantation. L'origine des cellules souches peut être variée : on pourra avoir recours aux progéniteurs circulants (ou EPC : endothelial progenitor cells) qui ne nécessiteraient qu'un prélèvement sanguin pour leur recueil mais ce procédé risque d'être long. D'autres sources peuvent actuellement être étudiées en particulier les cellules souches issues de la gelée de Wharton du cordon ombilical, qui sembleraient encore moins différenciées que les précédentes.

L'avantage d'avoir recours à ces cellules souches serait de pouvoir constituer une banque de vaisseaux disponibles en cas d'urgence.

Ce substitut ainsi réalisé devra avoir des propriétés semblables à celles des vaisseaux et il est donc essentiel de réaliser des tests mécaniques. Les tests devront mesurer la résistance à la pression et à l'étirement afin de s'assurer qu'une fois implanté, le substitut résiste à une pression même élevée et aucun anévrisme ne se développe. Enfin, le substitut, pour être implanté, doit être suturé. Il faudra donc s'assurer de la résistance à la suture de ce substitut. Il faudra aussi vérifier que les cellules de ce substitut réagissent de la même façon que celles d'une artère native (communication cellulaire, production et réaction au NO, ...).

A long terme, l'étape finale sera l'implantation *in vivo* chez l'animal. Le modèle animal choisi sera dans un premier temps le lapin (dont on connaît bien le comportement et l'évaluation), puis le substitut sera testé sur de plus gros animaux. Si ces essais sont concluants, des essais cliniques pourront être entrepris au travers de PHRC, en vue d'obtenir une AMM et le transfert de la technologie à un industriel.

II. Conclusion

L'ingénierie vasculaire tente de construire des substituts cellulés. Plusieurs techniques sont actuellement à l'étude mais l'approche que nous souhaitons développer au sein du laboratoire est la technique du "cell-sheet". Cette approche s'appuie sur la création de feuillets cellulaires qui seront enroulés en vue de reproduire au moins deux des trois tuniques des vaisseaux : media, intima.

La première étape de cette construction était de mettre au point le biomatériau capable de produire un feuillet détachable sur lequel les cellules pourront se développer. C'est ce travail qui a été réalisé. Etant une étude pilote, de nombreuses mises au point ont dû être effectuées.

CONCLUSION

L'acide alginique et ses dérivés ont été découverts dans les années 1860 par le Britannique Stanford. Depuis cette époque, l'intérêt pour cette molécule naturelle, puisqu'issue principalement des algues brunes, n'a cessé d'augmenter pour aboutir à une industrialisation et une commercialisation mondiale.

Cette substance à tout d'abord été étudiée afin d'en découvrir ses propriétés physico-chimiques. La principale, qui peut être mise en avant, est sa capacité de gélification. Ainsi décrits, les alginates vont pouvoir trouver une application dans de nombreux domaines allant de l'industrie textile à alimentaire en passant par l'imprimerie, la médecine, la cosmétologie,...

L'industrie pharmaceutique s'est intéressée très tôt à ces molécules afin de développer de nouveaux médicaments. Un médicament possède toujours un ou plusieurs principes actifs ; les alginates et leur propriété de gélification vont donc être utilisés à cet effet. Ainsi, certains pansements ont pour composant majeur l'alginate. Par pansements, il est sous-entendu :

- Les pansements cutanés,
- Les pansements gastriques,
- Les pansements hémostatiques.

L'indication des alginates est donc le traitement des plaies, du reflux gastro-œsophagien, des saignements,...

L'autre aspect du médicament est la pharmacie galénique. Les alginates trouvent ici encore des applications.

De par leurs multiples propriétés, ils vont être utilisés comme excipients des médicaments dans les fonctions suivantes : stabilisant, agent de suspension, agent de viscosité, liant pour comprimés, agent de désintégration pour comprimés, émulsifiant.

L'alginate, en se gélifiant, peut former des « billes ». Ces dernières peuvent contenir un principe actif qui va être libéré selon une cinétique connue et dans des conditions connues : c'est la microencapsulation, autre application de l'alginate.

Enfin l'ingénierie tissulaire s'intéresse de plus en plus aux alginates pour une utilisation en tant que biomatériau. Ses propriétés physico-chimiques, son origine naturelle, sa biodégradabilité,..., en font une substance « idéale » pour la construction d'un matériau biologique. Dans le cadre de l'ingénierie vasculaire, un biomatériau fonctionnalisé à base d'alginate va donc être développé et sera le support de cultures cellulaires en vue de l'obtention de « cell-sheet » qui seront ensuite assemblés pour créer un substitut vasculaire, traitement de dernier recours de l'athérosclérose.

Les alginates ont déjà beaucoup été étudiés et leurs utilisations sont nombreuses et variées. Cependant, au vu des qualités que peut présenter cette substance, les industries s'attachent encore à développer de nouvelles applications.

ANNEXES

ANNEXE 1

Extrait de la conférence de 1892

August 27, 1892.]

THE CHEMIST AND DRUGGIST.

301

THE PRESIDENT'S ADDRESS.

LADIES AND GENTLEMEN,—I have, in the first instance, to thank the Conference for the kind expression of confidence in electing me at Cardiff, in my absence, to the honourable position of President. When your committee first selected me I declined the honour, deeming it impossible that an outsider like myself could do justice to the cause, and that a brilliant flash of silence would suit me best. My friends in the committee would, however, take no denial, pointing out that I should only follow some former Presidents who also were not personally employed in the practice of pharmacy.

Moreover, as one of the founders of the Conference, present at the first meeting at Newcastle in 1863, and assisting at its birth, it was my duty to do anything and everything in my power to promote its best interests.

That duty I fully recognise and accept as a very pleasant one, hoping to follow—though a long way after—the eminent outsiders who have preceded me in this chair. I trust that all shortcomings may be made up by your kind assistance. It is said that outsiders often see the best of the game, and I shall claim the privilege of a sympathetic looker-on, and, perhaps, even dare to criticise some of the moves. It may also be interesting to “see ourselves as others see us,” although it is said we do not often want to repeat the experience. I represent a part of that great public which has already profited so largely by the growth of pharmacy and the increased education of pharmacists, and which has placed a great trust in your hands, and is waiting and watching to see how you keep it. A roving commission and a rambling statement must be allowed me—that of a “chieftain among ye takin’ notes,” a position which would make me rather nervous were it not for the very excellent unwritten rule that this meeting does not criticise the President’s address, except favourably—and you have placed me in the chair to see that your rules are properly respected.

FIRST MEETING.

The memory of that little inaugural meeting, held in a small room at Newcastle in 1863—the year I came to Scotland—supplies me at once with a suitable text. Twenty-one pharmacists, who attended the British Association there, met together and founded the British Pharmaceutical Conference. Twenty-nine years have passed away, and each year has added to its progress. In 1871, when the Conference met last in Edinburgh, it was eight years old, and even then had arrived at years of discretion.

I congratulate the members that they are again invited to this beautiful city, and receive another hearty welcome to modern Athens; and those of us who were present on the last occasion know well what that means. We who nursed this bantling in its infant stage could scarcely have expected that it would have grown so rapidly, and so great, and that the Year-book of Transactions should be looked forward to as an indispensable record of the world’s progress in pharmacy.

Indeed, so proud may we be of our offspring that I thank our friend Reynolds for his timely hint about “garrulous old nurses.”

I think it may be worth our while to pause for a moment, and look back to our birth-year, and see what the interval has done for us, and for our country at large—embracing, as the period does, the latter, the greater, and the better half of the Victorian era. What progress has the world around us made in science, in manufactures, in education; and has our pharmacy kept pace with the general advancement? Can we put down our Ebenezer here, and thank God and take courage as we look forward to greater possibilities?

LOSSES.

Looking back has its elements of regret; our attention is at once riveted on the serious gaps made in our ranks by the hand of Death—those eminent men, those dear friends, who have joined the majority, “where beyond these voices there is peace.” Who can fill the vacant spaces where Deane and Brady stood at our first meeting? The first volume of the Transactions contains a paper by Deane on the opium alkaloids, with microscopic illustrations, beautifully drawn by Brady, whose monograph on the *Challenger* foraminifera will alone hand down his name to posterity. We have lost the world-renowned Hanbury, who presided in 1867 and 1868 at Norwich and Exeter; Stoddart, who presided in 1870 and 1871 at Liverpool and Edinburgh; Williams, who presided in 1884 at Hastings; and last, and greatest of all, Redwood, who presided in 1876 and 1877 at Glasgow and Plymouth. Since our last meeting our generous friend Hills has passed away. We have also lost our dear friend John Mackay—who was secretary when we last met here—whose genial presence we miss so much, and whose loss to pharmacy in Scotland is irreparable. One quality was specially

notable in all: they were such lovable men—men with a halo around them, shedding light and love on all who came within their benign influence; men abounding in an enthusiasm which was wonderfully catching, and went far to secure the great success which has always attended the meetings of this Conference.

REDWOOD.

The lamented death of Professor Redwood, the Nestor of British pharmacy, is so recent that we have not yet got over it. He was long spared to us, with his wonderful talents and his great vitality preserved to the last, even to our own last meeting at Cardiff, in his native Glamorganshire; but soon after there was a noise amongst us as “when a standard-bearer fainteth,” and we can scarcely yet realise that our great champion has retired from the field. No one knows the inner character of a professor better than his assistant,



John Mackay
Secy. of the Association

ANNEXE 2

Culture cellulaire

Les cellules

Au cours de ces travaux, les cellules utilisées sont des cellules musculaires lisses issues de l'aorte de lapin. Il s'agit de la lignée U8A4. Ces cellules ont été fournies par le Dr Huguette LOUIS de l'unité Inserm U961 dirigée par le Dr. P. LACOLLEY.

L'avantage d'utiliser ce type de cellule est l'homogénéité de leur population, mais surtout la stabilité de ces cellules. De plus elles possèdent une capacité illimitée de division.

Le matériel

La culture de ces cellules s'effectue dans des boîtes de 75 cm² (Nunc, Deutcher France) en présence de 10ml de milieu de culture et à 37 °C.

Le milieu de culture est constitué de DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 ; Invitrogen, France) supplémenté avec :

- 5% de SVF (Sigma, France) pour l'apport de facteur de croissance ;
- 4 mg/ml d'HEPES (Sigma, France) afin de tamponner le milieu ;
- 100 UI/mL de pénicilline (Invitrogen, France) ;
- 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen, France) ;
- 2,5 µg/mL de Fungizone® (Invitrogen, France) .

Deux types de tampons isotoniques sont utilisés pour la culture et notamment lors des différents lavages :

- L'HBSS (Hank's balanced salt solution) est composé de KCl 0,4g/L, NaCl 8g/L, KH₂PO₄ 0,047 g/L, D-glucose 1 g/L, rouge de phénol 0,011 g/L. Ce tampon est acheté sous forme de poudre chez Sigma (France) et il est tamponné à pH 7,2-7,4.
- Le PBS (Phosphate Buffer Saline) qui est composé de NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM. Ce tampon est également à pH 7,2-7,4.

Ces deux tampons sont préparés dans de l'eau distillé puis filtrés sur une membrane de porosité 0,22 µm (Millipore, France) et conservés à 4 °C.

Une solution de trypsine-EDTA est utilisée pour détacher les cellules de leur support au cours des différents passages. Le mélange trypsine-EDTA à 0,25% (Sigma, France) contient 2,5g de trypsine porcine et 0,2 g d'EDTA tétrasodique dans 100 mL de tampon HBSS.

La culture

Les cellules d'aorte sont lavées avec du tampon HBSS à deux reprises et tous les deux jours. Après ces lavages, elles sont remises en culture à l'étuve.

Après quelques jours de culture, les cellules arrivent à confluence. Il faut alors les détacher du support pour réaliser ainsi un passage en subculture. Ces cellules sont lavées deux fois avec du HBSS. Ces lavages sont nécessaires à l'élimination du milieu qui contient du sérum et qui inhibe l'action de la trypsine, mais également pour permettre la libération des ions Ca^{2+} qui vont faciliter le détachement des cellules.

Une fois ces lavages réalisés, les cellules sont incubées 3 min avec 5 mL de trypsine-EDTA à 37°C. La trypsine va cliver les liaisons cellules-cellules et cellules-support, ce qui va être vérifié par microscopie optique à contraste de phase.

L'étape suivante consiste à inhiber l'activité enzymatique de la trypsine en ajoutant du milieu (contenant du sérum). Les cellules sont alors en suspension dans cette solution qui va être centrifugée à 250 g pendant 10 minutes. Le surnageant va être éliminé et le culot contenant les cellules être remis en suspension dans 5 mL de milieu de culture.

Cette suspension cellulaire va permettre d'ensemencer différents support de culture à certaines concentrations après comptage cellulaire.

Le comptage cellulaire s'effectue avec du bleu trypan (Sigma, France) et une chambre de Thoma. La suspension cellulaire est diluée au quart avec du bleu trypan. La dilution est placée dans la chambre de Thoma pour compter les cellules vivantes, c'est-à-dire non colorées. Deux comptages sont effectués et la moyenne est réalisée. Le nombre de cellules par mL de milieu est défini par la formule suivante :

$$N = m * 4 * 10^4 \text{ avec } m = \text{moyenne du nombre de cellules dans chaque chambre}$$
$$4 = \text{facteur de dilution}$$
$$10^4 = \text{coefficient de la chambre de Thoma}$$

Congélation et décongélation des cellules

A chaque ensemencement il reste des cellules non utilisées. Elles sont alors congelées.

Les cellules sont lavées puis trypsinées. Le tout est centrifugé à 250 g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé puis le culot est resuspendu dans du SVF. Les cellules sont congelées à une densité de un million par cryotube, soit par mL en présence de 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma, France) afin de les préserver de la cristallisation.

Le DMSO étant toxique à température ambiante, il est nécessaire de congeler rapidement. Le cryotube est placé dans une solution d'isopropanol, puis placé à -80°C. L'isopropanol permet la descente progressive en température. Après 24h à -80°C ; les cellules doivent être placées dans l'azote liquide.

La décongélation des cellules, doit être la plus rapide possible et les cellules sont diluées dans 30 ml d'HBSS afin d'inhiber au maximum l'effet néfaste du DMSO.

Les cellules sont ensuite centrifugées à 250 g pendant 10 min, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 5 mL de milieu. Les cellules peuvent enfin être ensemencées.

ANNEXE 3

Viabilité cellulaire

Principe

La viabilité cellulaire est mesurée par la détermination du métabolisme cellulaire au moyen du test de l'Alamar Blue™ (Serotec, France) qui est un test de prolifération cellulaire. Il contient un indicateur coloré bleu qui se réduit en rose en fonction de l'intensité de l'activité mitochondriale des cellules. Au cours de la respiration, les cellules produisent des composés réducteurs tels que FADH₂, NADH, NADPH qui ont une activité cytochromique et qui réduisent l'Alamar Blue présent dans le milieu. En mesurant l'absorbance à 570 et à 600 nm, il est possible d'en déduire le pourcentage de réduction reflétant semi-quantitativement la viabilité cellulaire.

$$\% \text{ de réduction} = \frac{(\text{Eox600} * \text{A570}) - (\text{Eox570} * \text{A600})}{(\text{Ered570} * \text{Actrl600}) - (\text{Ered600} * \text{Actrl570})}$$

Cette formule fait intervenir les coefficient d'extinction molaires de l'Alamar Blue de la forme oxydée à 570 nm (Eox570), à 600 nm (Eox600), et de la forme réduite à 570 nm (Ered570) et à 600 nm (Ered600). Ce pourcentage prend également en compte les absorbances à 570 et 600 nm de l'échantillon (respectivement A570 et A600) et du contrôle négatif (Actrl570 et Actrl 600).

Les coefficients d'extinction molaires pour l'Alamar Blue à 10% sont les suivants :

Eox570 = 80.586, Eox600 = 117.216, Ered570 = 155.677, Ered600 = 14.652

Protocole

L'Alamar Blue est dilué à 10% dans du DMEM sans rouge de phénol : l'intérêt d'utiliser ce milieu est de conserver les conditions de culture les plus proches des conditions standard.

Les cellules sont lavées trois fois avec le DMEM sans rouge de phénol afin d'éliminer totalement le rouge de phénol contenu dans le milieu de culture. Ensuite la solution préparée

est mise à incuber dans les puits de culture (le volume déposé est identique dans chaque puits de même contenance). Les cellules sont mises à incuber pendant 4 heures à 37°C.

Pour chaque test, il est nécessaire de réaliser un contrôle négatif qui consiste à incuber le même volume d'Alamar Blue 10% dans un puits sans cellules.

Le milieu de chaque puits est alors transférée dans une plaque 96 puits. Le contenu de chaque puits est réparti en quatre volumes de 100µL.

ANNEXE 4

Protocole d'immunomarquage

Le phénotype du muscle lisse est déterminé par l'expression de marqueurs fortement exprimés par les cellules différenciées tel que :

- α -SMA (Smooth Muscle Actine) (Dako, France) ;
- SM-MHC (Smooth Muscle-Myosin Heavy Chain) (Dako, France) ;
- Calponine (Dako, France) .

On réalise un immuno-marquage indirect, c'est-à-dire que la molécule d'intérêt est reconnue spécifiquement par un anticorps primaire. Un deuxième anticorps est utilisé afin de mettre en évidence la formation du complexe récepteur-anticorps primaire. L'anticorps secondaire est alors couplé à un fluorochrome.

Les cellules sont d'abord fixées avec du PAF 1% dilué dans du PBS (paraformaldéhyde, Sigma, France) pendant 10 minutes à 37°C. Elles sont ensuite perméabilisées à l'aide du Triton-X 0,5% (Sigma, France) dilué dans du PBS pendant 15 minutes. La perméabilisation permet aux anticorps de se fixer sur la molécule d'intérêt qui est intracellulaire.

Une fois perméabilisées les cellules sont incubées pendant 45 minutes dans la solution d'anticorps primaire. Cette dernière est une solution de l'anticorps commerciale diluée au 1/50^{ème} dans du Triton-X 0,1%.

Ensuite deux lavages au PBS sont réalisés. L'anticorps secondaire pourra alors être incubé pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. A la différence de l'anticorps primaire, le secondaire est dilué au 1/100^{ème}. Deux lavages successifs sont à nouveau réalisés, puis les lames sont conservées dans du PAF 1% à 4°C à l'abri de la lumière.

L'organisation des cellules et leur adhésion sont vérifiées par le marquage du cytosquelette à l'aide de la phalloïdine (Invitrogen, France). Celui-ci est marqué par un immunomarquage direct. La molécule d'intérêt est alors reconnue spécifiquement par un anticorps couplé directement au fluorochrome.

Le protocole est ensuite quasiment identique au précédent, seules deux étapes sont supprimées : l'incubation de l'anticorps primaire et les rinçages qui suivent cette étape.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE PARTIES I / II / III

Anonyme, Annotations (nécrologie), Pharm. J., 1899 (16 déc.), 591.

Anonyme, Stanford, Kelp and Scotland, Pharm. J., 1964 (13 juin), 595.

Anonyme, The President's address, Chemist and druggist, 1892 (27 août), 301 (portrait de Stanford).

Bruneton J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} édition, Tec et Doc, Paris, 1999, pp. 45-52.

Bruneton J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 4^{ème} édition, Tec et Doc, Paris, 2009, pp. 49-50.

Einmahl S., Dispositif d'administration oculaire, dans : Falson-Rieg F., Faivre V., Pirot F., Nouvelles formes pharmaceutiques, Tec et Doc, Paris, 2004, Chap.9, p. 188.

Gaussem P., Aiach M, Biochimie Hématologie, Physiologie de l'hémostase primaire et de la coagulation, Le Moniteur internat, Groupe liaison, Rueil-Malmaison, 3^{ème} édition, 2007, pp. 819-826.

Goris A., Liot A., Janot M.M., Goris A., Pharmacie galénique, Masson, Paris, 1949, tome 2, p. 1928.

Guyton A.C., Traité de physiologie médicale, Doin, Paris, 1^{ère} édition, 3^{ème} tirage, 1989, pp. 790-791 et 811-812. (11^{ème} partie : l'appareil digestif, 64 fonctions sécrétoires du tube digestif ; sécrétion gastrique, physiopathologie des troubles gastro-intestinaux).

Hernandez R.M., Orive G., Ponce S., Gascon A.R., Igartua M., Pedraz J.L., Study of the *in vivo* antigenic response of microcapsules elaborated with different alginates, Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, Florence, 2002, pp. 875-876.

Hienne S., Cuny J.-F., Callanquin J., Faure P., Labrude P., Les pansements des plaies. Guide à l'usage des praticiens, Pharmathèmes Edition, Paris, 2008, 160 p.

<http://plaies.ifrance.com/> consulté le 12 mai 2010.

<http://www.cargilltexturizing.com/>, consulté le 02 décembre 2009.

<http://www.ephe.univ-montp2.fr/>, consulté le 14 avril 2010.

<http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4765E/y4765e08.htm>, consulté le 02 décembre 2009.

<http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e04.htm>, consulté le 02 décembre 2009.

<http://www.fmcbiopolymer.com/>, consulté le 02 décembre 2009.

<http://www.genialab.de/>, consulté le 02 décembre 2009.

Jouanneau D., Les phycocolloïdes, www.sb.roscoff.fr/Phyto, consulté le 6 avril 2010.

Laboratoires Brothier, <http://brothier.com/>, consulté le 12 avril 2010.

La Revue du praticien, 2001, 51, 790.

Lecompte T., Médicaments antiplaquettaires, dans : Manuel d'hémostase, Elsevier, Paris, 1995, p. 678.

Le Hir A., Chaumeil J.-C., Brossard D., Pharmacie galénique - Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, Elsevier-Masson, Paris, 2009, 9^{ème} édition, pp. 36-38.

Les colloïdes, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Colloide>, consulté le 2 mars 2010.

Paris R.P., Moyse H., Matière médicale, Masson, Paris, 1976, 2^{ème} édition, tome 1, pp. 357-61.

Levy-Toledano S., Dupuy E., Physiologie de l'hémostase primaire, dans : Manuel d'hémostase, Elsevier, Paris, 1995, p. 19-37.

Mjahed H., Caractérisation physico-chimique des films multicouches de polyélectrolytes à base de polysaccharides et de polypeptides en vue d'applications dans le domaine des biomatériaux, thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, 2009, pp. 22-29.

Monshipouri M., Liposome-Hydrogel hybrids, Citus Books, 1999, volume 2, pp. 1461-1732.

Pharmacopée Européenne, Cuncil of Europe Publishing, 6ème édition, 2007, pp. 1013-1014.

Photo de *Fucus serratus*, <http://www.biopix.com/>, consulté le 29 avril 2010.

Photo de *Fucus vesiculosus*, <http://abacus.bates.edu/> , consulté le 29 avril 2010.

Photo de *Laminaria digitata*, <http://manger-la-mer.org/>, consulté le 29 avril 2010.

Poncelet D., Dreffier C., Subra-Paternault P., Vandamme T., Introduction aux techniques de micro-encapsulation, dans : Vandamme T., Poncelet D., Subra-Paternault P., Micro-encapsulation - Des sciences aux technologies, Tec et Doc, Paris, 2007, Chap.1, pp. 3-7.

Renard D., Reddy T., Polymères d'origine biologique pour la micro-encapsulation, dans : Vandamme T., Poncelet D., Subra-Paternault P., Micro-encapsulation - Des sciences aux technologies, Tec et Doc, Paris, 2007, Chap.12, pp. 175-188.

Rowe C.R., Sheskey P.J., Weller P.J., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, Londres, 2003, 4^{ème} édition, pp. 16-18, 524-524, 543-544.

Sherwood L., Physiologie humaine, De Boeck Université, Paris, 1^{ère} édition, 2000, p. 436.

Stequert A., Transfert de matière dans les gels d'alginate, thèse de diplôme d'Etat de docteur en pharmacie, Nancy, 2002, pp. 21-30.

Szefner J., L'hémostase... autrement ?, Phase J, Paris, 2008, pp. 14-16, 30-31.

Tortora G.J., Grabowski S.R., Principes d'anatomie et de physiologie, De Boeck Université, Bruxelles, 2001, 3^{ème} édition française, pp. 867-916.

Vatier J., Lamarque D., Médicaments, Antisécrétoires gastriques, Le Moniteur internat, Groupe liaison, Rueil-Malmaison, 3^{ème} édition, 2007, pp. 694-717.

Vidal 2009, Le Dictionnaire, Editions du Vidal, Paris, 2009.

Vidal 2010, Le Dictionnaire, Editions du Vidal, Paris, 2010.

Vital-Durand D., Le Jeunne C. (sous la dir.de), Dorosz 2009, Guide pratique des médicaments, Maloine, Paris, 28^{ème} édition, 2009.

BIBLIOGRAPHIE PARTIE IV

BABIJ P., KAWAMOTO S., WHITE S., ADELSTEIN R.S., PERIASAMY M.

Differential expression of SM1 and SM2 myosin isoforms in cultured vascular smooth muscle.
Am. J. Physiol., 1992, **262** : 607-13.

BERTHELEMY N., KERDJOU DJ H., GAUCHER C., SCHAAF P., STOLTZ J-F.,
LACOLLEY P., VOEGEL J-C., MENU P.

Polyelectrolyte films boost progenitor cell differentiation into endothelium-like monolayers.
Adv. Mater., 2008, **20**, 2674–78.

BERTHELEMY N., KERDJOU DJ H., SCHAAF P., PRIN-MATHIEU C., LACOLLEY P.,
STOLTZ J-F., VOEGEL J-C., MENU P.

O₂ level controls hematopoietic circulating progenitor cells differentiation into endothelial or smooth muscle cells.

PLoS One, 2009, **4** : e5514.

BOURA C., KERDJOU DJ H., MOBY V., VAUTIER D., DUMAS D., SCHAAF P.,
VOEGEL J-C., STOLTZ J-F., MENU P.

Initial adhesion of endothelial cells on polyelectrolyte multilayer films.

Biomed. Mater. Eng., 2006, **16**: 115-21.

CHIAVEGATO A., ROELOFS M., FRANCH R., CASTELLUCCI E., SARINELLA F.,
SARTORE S.

Differential expression of SM22 isoforms in myofibroblasts and smooth muscle cells from rabbit bladder.

J. Muscle Res. Cell Motil., 1999, **20** : 133-46.

DECHER G., HONG J.D., SCHMITT J.

Buildup of ultrathin multilayer films by a self assembly process. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surface.

Thin Solid Films, 1992, **210/211** : 831-35.

GABBIANI G., SCHMID E., WINTER S., CHAPONNIER C., DE CKHASTONAY C.,
VANDEKERCKHOVE J., WEBER K., FRANKE W.W.

Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1981, **78** : 298-302.

GENES N.G., ROWLEY J.A., MOONEY D.J., BONASSAR L.J.

Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces.

Arch. Biochem. Biophys., 2004, **422** : 161-67.

HARA M., YAMAKI A., MIYAKE J.

Noninvasive detachment of cells on cells.

Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems, 2001, **17** : 107-112.

HAUG A., LARSEN B.

Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates.

Acta Chem. Scand., 1962, **16** : 1908-18.

HOERSTRUP S.P., ZUND G., SODIAN R., SCHNELL A., GRUNENFELDER J., TURINA M.

Tissue engineering of small caliber vascular grafts.

Europ. J. Cardio-thor. Surg., 2001, **20** : 164-9.

IWASAKI K., KOJIMA K., KODAMA S., PAZ A., CHAMBERS M., UMEZU M.,
VACANTI C.

Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor.

Circulation, 2008, **118** : 52-7.

KERDJOUDJ H., BOURA C., MARCHAL L., DUMAS D., SCHAFF P., VOEGEL J-C.,
STOLTZ J-F., MENU P.

Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering.

Biomed. Mater. Eng., 2006, **16** : 123-9.

KERDJOUDJ H., BERTHELEMY N., RINCKENBACH S., KEARNEY-SCHWARTZ A., MONTAGNE K., SCHAAF P., LACOLLEY P., STOLTZ J-F., VOEGEL J-C., MENU P.
Small vessel replacement by human umbilical arteries with polyelectrolyte film-treated arteries: in vivo behavior.

J. Am. Coll. Cardiol., 2008, **52** : 1589-97.

KERDJOUDJ H., BERTHELEMY N., BOULMEDAIS F., STOLTZ J-F., MENU P., VOEGEL J-C.

Multilayered polyelectrolyte films: a tool for arteries and vessel repair.

Soft Mat., 2010, **6** : 1-14.

KOTOV N.A., MAGONOV S., TROPSHA E.

Layer-by-layer self-assembly of aluminosilicate/polyelectrolyte composites: mechanism of deposition, crack resistance, and perspectives for novel membrane materials.

Chemistry of Materials., 1998, **10** : 886- 95.

LAVALLE P., GERGELY C., CUISINIER F. J. G., DECHER G., SCHAAF P., VOEGEL J-C., PICART C.

Comparison of the structure of polyelectrolyte multilayer films exhibiting a linear and an exponential growth regime: an *in situ* atomic force microscopy study.

Macromolecules, 2002, **35** : 4458-65.

LEINFELDER U., BRUNNENMEIER F., CRAMER H., SCHILLER J., ARNOLD K., VASQUEZ J.A., ZIMMERMANN U.

A highly sensitive cell assay for validation of purification regimes of alginates.

Biomaterials, 2003, **24** : 4161-72.

L'HEUREUX N., PAQUET S., LABBE R., GERMAIN L., AUGER F.A.

A completely biological tissue-engineered human blood vessel.

FASEB J., 1998, **12**, 47-56.

L'HEUREUX N., DUSSERRE N., KONIG G., VICTOR B., KEIRE P., WIGHT T.,
CHRONOS N., KYLES A., GREGORY C., HOYT G., ROBINS R., McALLISTER T.
Human tissue engineered blood vessel for adult arterial revascularization.
Nat. Med., 2006, **12** : 361-5.

MOBY V., BOURA C., KERDJOU DJ H., VOEGEL J-C., MARCHAL L., DUMAS D.,
SCHAAF P., STOLTZ J-F., MENU P.
Poly(styrenesulfonate)/poly(allylamine) multilayers: a route to favor endothelial cell growth
on expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts.
Biomacromolecules, 2007, **8** : 2156-60.

NIKLASON L.E., GAO J., ABBOTT W.M., HIRSCHI K.K., HOUSER S., MARINI R.,
LANGER R.
Functional arteries grown in vitro.
Science, 1999; **284** : 489-93.

NOVIKOV L.N., NOVIKOVA L.N., MOSAHEBI A., WIBERG M., TERENCEHI G.,
KELLERTH J.O.
A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury.
Biomaterials, 2002, **23** : 3369-76.

SEELY G.R., HART R.L.
The binding of alkaline earth metal ions to alginate.
Macromolecules, 1974, **7** : 706-10.

STEPHAN S., BALL S., WILLIAMSON M., BAX., LOMAS A., SHUTTLEWORTH C.A.,
KIETLY C.M.
Cell-matrix biology in vascular tissue engineering.
J. Anat., 2006, **209** : 495-2.

TAMPIERI A., SANDRI M., LANDI E., CELOTTI G., ROVERI N., MATTIOLI-
BELMONTE M., VIRGILI L., GABBANELLI F., BIAGINI G.
HA/alginate hybrid composites prepared through bio-inspired nucleation.
Acta Biomaterialia, 2005, **1** : 343-51.

UEKI N., SOBUE K., KANDA K., HADA T., HIGASHINO K.

Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1987, **84** : 9049-53.

VAN DER LOOP F.T., SCHAAART G., TIMMER E.D., RAMAEKERS F.C., VAN EYS G.J.

Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells.

J. Cell Biol., 1996, **134** : 401-11.

SMIDSROD O., PAINTER T.

Effect of periodate oxidation upon the stiffness of the alginate molecule in solution.

Carbohydr. Res., 1973, **26** : 125-32.

VANDEKERCKHOVE J., WEBER K.

At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide.

J. Mol. Biol., 1978, **126** : 783-802.

WEINBERG C.B., BELL E.

A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells.

Science, 1986; **231** : 397-400.

WINDER S.J., SUTHERLAND C., WALSH M.P.

A comparison of the effects of calponin on smooth and skeletal muscle actomyosin systems in the presence and absence of caldesmon.

Biochem. J., 1992, **288** : 733-9.

YOW K.-H., INGRAM J., KOROSSIS S.A., INGHAM E., HOMER-VANNIASINKAM S.

Tissue engineering of vascular conduits.

Brit. J. Surg., 2003, **93** : 652-1.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 2 juillet 2010

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par Emilie VINCENT

Sujet : Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie. Application à la construction d'un biomatériau.Jury :Président : Pierre LABRUDE, Professeur
Directeur : Pierre LABRUDE, ProfesseurJuges : Patrick MENU, Professeur
Jean-Claude VOEGEL, Directeur de recherche
INSERM
Hajare MJAHER, Stagiaire post-doctorante

Vu,

Nancy, le 02 juin 2010

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse



Professeur P. Labrude

Vu et approuvé,

Nancy, le 07 juin 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,
Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 10.06.2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,
Jean-Pierre FINANCE
C. CAPDEVILLE ATKINSON

N° d'enregistrement : 3330.

TITRE

**LES ALGINATES ET LEURS APPLICATIONS EN PHARMACIE
ET EN INGENIERIE
APPLICATION A LA CONSTRUCTION D'UN BIOMATERIAU**

Thèse soutenue le 02 juillet 2010

Par Emilie VINCENT

RESUME :

Les alginates, polymères saccharidiques extraits principalement des algues brunes de la classe de Phéophycées, sont des substances très peu connues du grand public mais qui trouvent des applications dans de nombreux domaines et de nombreuses industries. Leurs usages reposent sur leurs propriétés de gélification qui se traduisent par une chélation des cations divalents par les monosaccharides, et principalement par les acides guluroniques, le cation divalent le plus utilisé étant le calcium.

Dans notre travail, deux grands domaines d'applications ont été détaillés : la pharmacie et l'ingénierie tissulaire.

Dans le domaine de la pharmacie, les alginates sont employés pour trois propriétés différentes. Ils constituent d'abord le principe actif de pansements cutanés comme l'Algostéril®, de pansements hémostatiques comme le Coalgan®, et de pansements gastriques comme le Gaviscon®. Ils sont par ailleurs présents dans de nombreux médicaments en tant qu'excipients, où ils agissent comme agent de viscosité, agent stabilisant,... Enfin, des technologies comme la microencapsulation emploient l'alginate en vue de modifier la cinétique de libération du ou des principes actifs encapsulés.

L'alginate étant biocompatible, atoxique et non immunogène, il constitue un bon composant en vue de la réalisation d'un biomatériau. C'est dans ce cadre qu'a été effectuée la partie expérimentale du présent travail qui s'inscrit dans la thématique de l'athérosclérose et de son traitement par substitution vasculaire. Dans ce contexte, mon but a été de mettre au point une matrice à base d'alginate destinée à la construction d'un feuillet cellulaire, première étape de la construction *in vitro* d'un substitut vasculaire biosynthétique.

MOTS CLES : ALGINATES, APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES DES ALGINATES, INGENIERIE VASCULAIRE, SUBSTITUT VASCULAIRE, BIOMATERIAU.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Professeur Pierre LABRUDE	Groupe d'ingénierie cellulaire et tissulaire	Expérimentale ☒
	UMR CNRS 7561	Bibliographique ☒
	Faculté de médecine	Thème ☒
	Physiologie	
	Faculté de pharmacie	

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle