

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA 1
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



THESE DE DOCTORAT

en Génie des Procédés

Spécialité : Génie des Procédés des Matériaux

**Synthèse et caractérisation des biopolymères en vue
d'une application pharmaceutique**

Par

BENKHIRA Ilyas

Devant le Jury composé de :

N.BOUCHENAFSA-SAIB	Professeur	Université Blida1	Présidente
A.HADJ-ZIANE	Professeur	Université Blida1	Examinatrice
R.RIHANI	Professeur	Université USTHB	Examinatrice
F.ZERMANE	Professeur	Université Blida1	Directrice de thèse
B.CHEKNANE	Professeur	Université Blida1	Codirecteur de thèse

Blida, Février 2025

RÉSUMÉ

Les pansements jouent un rôle essentiel dans la protection des tissus blessés et la facilitation du processus de cicatrisation. Cependant, la fabrication de pansements antibactériens implique souvent des procédures complexes et l'utilisation de composants toxiques. Dans cette étude, nous avons développé un film hydrogel innovant (AP:GE@OTA/Ag) composé de pectine amidée (AP), de gélatine (GE), d'acide tannique oxydé (OTA) à différentes concentrations (de 0 à 5 % en poids) et de nanoparticules d'argent (AgNPs) formées in situ. Notre méthode, économiquement viable, exploite le potentiel d'un mélange polysaccharide-protéine biocompatible pour favoriser la cicatrisation des plaies. Les analyses IR-FT et DRX ont confirmé que la réticulation se produit par des interactions entre les groupes quinones de l'OTA et les groupes amines libres dans l'AP et le GE. Les images MEB ont révélé des structures homogènes et interconnectées, tandis que les images MET ont montré une bonne dispersion des AgNPs à la surface avec une taille moyenne de particule de 58,64 nm. De plus, les mesures TG ont montré une amélioration significative de la stabilité thermique des films AP:GE@OTA/Ag par rapport aux films AP:GE. Les films AP:GE@OTA/Ag ont montré une capacité d'absorption des fluides améliorée (90,96 % à 2h), une capacité de rétention d'eau accrue (91,69 % à 2h), un taux de transmission de vapeur d'eau de 1903,29 g/m²/jour, tout en améliorant la résistance à la traction (38 MPa). En outre, ces films d'hydrogel ont montré une excellente cytocompatibilité et une activité antimicrobienne soutenue contre *S. aureus* et *E. coli* avec une faible charge d'AgNPs de $1,02 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Les cellules NIT-1 de l'insulinome murin ont montré une prolifération robuste lorsqu'elles étaient cultivées avec les pansements préparés. Ces structures nanocomposites ont accéléré de manière significative la réparation des plaies dans un modèle d'excision cutanée, ce qui implique leur potentiel pour des applications clinique en cicatrisation des plaies.

Mots clés : Biopolymères, réticulation, film d'hydrogel, nanoparticules d'argent, cicatrisation des plaies.

ABSTRACT

Wound dressings play a crucial role in protecting injured tissues and promoting the healing process. Traditional fabrication of antibacterial wound dressings can be complex and may involve toxic components. In this study, we developed an innovative hydrogel film (AP:GE@OTA/Ag) composed of amidated pectin (AP), gelatin (GE), oxidized tannic acid (OTA) at varying concentrations (from 0 to 5% by weight), and in-situ reduced silver nanoparticles (AgNPs). Our approach, based on an economically feasible method, harnesses the potential of a biocompatible polysaccharide to promoting wound healing. FTIR and XRD analyses confirmed that crosslinking occurs via interactions between OTA quinone groups and free amino groups in AP and GE. SEM images showed homogenous and interconnected structures while TEM imaging demonstrated the well-dispersed AgNPs with an average particle size of 58.64 nm. The TG measurements indicated the enhancement of the thermal stability compared to AP:GE films. The AP:GE@OTA/Ag films exhibited superior fluid uptake ability (90.96% at 2 hours), water retention capacity (91.69% at 2 hours), and water vapor transmission rate (1903.29 g/m²/day), alongside improved tensile strength (38 MPa). Additionally, these films showed excellent cytocompatibility and sustained potent antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* with low AgNPs loadings of $1.02 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. NIT-1 mouse insulinoma cells demonstrated robust proliferation when cultured with the prepared dressings. These films significantly accelerated wound repair in a skin excision model, indicating their potential clinical applications for wound healing.

Keywords: Biopolymers, crosslinking, hydrogel film, silver nanoparticles, wound healing.

ملخص

تلعب الضمادات الحيوية دورًا أساسيًا في حماية الأنسجة المصابة وتسريع عملية الشفاء، خاصة في حالات الجروح المعقدة والمزمنة. في هذه الدراسة، تم تطوير غشاء هيدروجل مبتكر (AP:GE@OTA/Ag) يعتمد على مكونات صديقة للبيئة تشمل البكتين الأميدي (AP)، الجيلاتين (GE)، وحمض التانين المؤكسد (OTA) بتركيزات متنوعة (من 0 إلى 5% بالوزن)، بالإضافة إلى الجسيمات النانوية الفضية (AgNPs) المختزلة في الموقع. تعتمد منهجيتنا، المبنية على طريقة اقتصادية، على استغلال خلاط البوليساكاريدات-البروتينات الصديقة للبيئة لتحفيز عملية التئام الجروح. أظهرت التحاليل FTIR و XRD أن عملية الربط التشابكي هي نتيجة للتفاعلات بين مجموعات الكينون في OTA ومجموعات الأمين المتاحة في AP و GE. كما كشفت صور SEM عن هياكل متجانسة ومتراصة، بينما أظهرت صور TEM تشتتًا جيدًا لـ AgNPs على السطح بمتوسط حجم جسيم يبلغ 58.64 نانومتر. أظهرت قياسات TG تحسنًا كبيراً في الثبات الحراري لغشاء AP:GE@OTA/Ag مقارنة بغشاء AP:GE. تميزت الأغشية المصنوعة AP:GE@OTA/Ag بقدرة امتصاص محسنة للسوائل (90.96% في ساعتين)، وزيادة في قدرة الاحتفاظ بالماء (91.69% في ساعتين)، ومعدل منافس لنقل بخار الماء (1903.29 جرام/متر مربع/يوم)، وكذلك مقاومة شد محسنة تبلغ 38 ميغا باسكال. علاوة على ذلك، أظهرت هذه الأفلام الهيدروجيلية توافقًا خلويًا ممتازًا ونشاطًا مضادًا للميكروبات ضد المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية مع تحميل منخفض من AgNPs قدره 0.13 ± 1.02 ميكروغرام / سم². بالإضافة إلى ذلك، أظهرت خلايا انسولينوما الفأر NIT-1 تكاثرًا قويًا عندما تمت زراعتها مع الضمادات المحضرة. هذه الهياكل المركبة ساهمت بشكل كبير في تسريع عملية الالتئام في نموذج جرح الجلد، مما يشير إلى إمكانياتها في التطبيقات السريرية في تسريع علاج الجروح.

الكلمات المفتاحية: البوليمرات الحيوية، الربط التشابكي، غشاء الهيدروجيل، الجسيمات النانوية الفضية، التئام الجروح.

AVANT PROPOS

Ce projet de recherche a été réalisé au sein du laboratoire CPIMAE, affilié au Département de Génie des Procédés de la Faculté de Technologie de l'Université de Blida 1 (USDB), sous la supervision bienveillante de la Pr. Faiza ZERMANE. Je souhaite lui exprimer ma profonde gratitude pour son accueil au sein de son équipe, ainsi que pour la générosité et le soutien constants qu'elle a manifestés tout au long de ce parcours.

L'achèvement de cette thèse a été une aventure marquante, rendue possible grâce au soutien et aux conseils précieux de plusieurs personnes extraordinaires. Mes remerciements les plus sincères vont d'abord à mes directeurs de thèse, Pr. ZERMANE Faiza et Pr. CHEKNANE Benamar, pour leur accompagnement sans faille. Leur confiance et leurs orientations éclairées ont été des éléments essentiels pour la réussite de ce travail, et je leur souhaite sincèrement de poursuivre avec succès dans toutes leurs entreprises.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury de soutenance pour avoir généreusement accepté et consacré de leur temps précieux pour juger ce travail et en améliorer la qualité grâce à leurs observations et recommandations constructives.

Ma gratitude s'étend aussi à toutes les personnes qui ont contribué aux analyses physicochimiques et spectroscopiques, notamment dans divers centres de recherche externes tels que l'INCC, le CRAPC et le CRBT, ainsi qu'à mes collègues chercheurs, en particulier Dr Salim CHELOUCHE, avec qui j'ai partagé des moments aussi précieux que stimulants au fil des années.

Enfin, un merci tout spécial à ma famille : mes parents, mes frères, mon épouse et mes enfants, pour leur soutien moral tout au long de cette thèse et leur présence à mes côtés dans chaque étape de cette aventure.

Table des matières

RÉSUMÉ

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTES DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GÉNÉRALE

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction.....	5
1.2. Généralités sur les biopolymères.....	6
1.2.1. Sources des biopolymères.....	7
1.1.2. Classification des biopolymères.....	7
1.2.3. Propriétés des biopolymères.....	8
1.2.3.1. La non-toxicité des biopolymères.....	8
1.2.3.2. La biocompatibilité des biopolymères.....	9
1.2.3.3. La biodégradabilité des biopolymères.....	10
1.2.3.4. Les propriétés mécaniques des biopolymères.....	11
1.3. Aperçu sur la pectine en tant que biopolymère.....	12
1.3.1. Origine, structure et techniques d'extraction de la pectine.....	12
1.3.2. Propriétés physico-chimiques de la pectine.....	15
1.3.3. Modification de la pectine.....	17
1.3.4. Stratégie de réticulation de la pectine avec les protéines.....	19
1.4. Notions de base sur les hydrogels à base de pectine.....	21
1.4.1. Définitions.....	21
1.4.2. Méthodes de fabrication des films d'hydrogel.....	22
1.4.2.1. Méthode de moulage par coulée.....	22
1.4.2.2. Méthode de polymérisation radicalaire libre.....	23
1.4.2.3. Méthode d'impression en 3D.....	24
1.4.2.4. Méthode d'électrofilage.....	25

1.4.3. Les hydrogels à base de pectine et leur renforcement.....	26
1.4.4. Applications pharmaceutiques des hydrogels de pectine	34
1.4.4.1. Utilisation des hydrogels de pectine dans la libération contrôlée des médicaments.	35
1.4.4.2. Utilisation des hydrogels de pectine pour la cicatrisation des plaies	40
1.4.4.3. Utilisation des hydrogels à base de pectine pour la thérapie anticancéreuse	43
1.4.4.4. Utilisation des hydrogels de pectine pour l'ingénierie tissulaire.....	45

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Introduction.....	47
2.2. Produits utilisés.....	48
2.3. Méthodes suivies.....	48
2.3.1. Synthèse de la pectine amidée.....	49
2.3.2. Oxydation de l'acide tannique.....	49
2.3.3. Elaboration des films d'hydrogel AP:GE@OTA et AP:GE@OTA/Ag.....	49
2.3.4. Quantification de la composition des films d'hydrogel.....	51
2.3.4.1. Détermination du degré d'amidation (DA).....	51
2.3.4.2. Détermination de la teneur en amine et du degré de réticulation.....	51
2.4. Caractérisation des films d'hydrogel obtenus.....	52
2.4.1. Analyse des propriétés structurale et élémentaire des films d'hydrogel.....	52
2.4.1.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF)	52
2.4.1.2. Radiocristallographie par Diffraction des Rayons X (DRX).....	53
2.4.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire du Proton (¹ H-RMN)	53
2.4.1.4. Microfluorescence X (micro-XRF)	53
2.4.2. Examen morphologique des films d'hydrogel.....	54
2.4.2.1. Microscopie Électronique à Balayage associée à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X (MEB-EDX)	54
2.4.2.2. Microscopie Électronique à Transmission (MET).....	54
2.4.3. Analyse de la résistance à la traction des films d'hydrogel.....	55
2.4.4. Etude des propriétés barrières.....	55
2.4.4.1. Capacité d'absorption de fluide (test de gonflement)	55
2.4.4.2. Capacité de rétention d'eau (la mesure de l'humidité résiduelle).....	56
2.4.4.3. Taux de transmission de vapeur d'eau (WVTR).....	56
2.4.5. Comportement thermique des films d'hydrogel.....	56
2.4.5.1. Thermogravimétrie (TG)	56

2.4.6. Etude <i>in vitro</i> de la cinétique de libération d'argent à partir des films d'hydrogel.....	57
a) Mode opératoire.....	57
b) Modélisation mathématique de la cinétique de libération de l'argent	58
2.4.7. Evaluation de la cytocompatibilité des films d'hydrogel avec le test XTT.....	60
a) Etape de préparation de la culture cellulaire.....	60
b) Test de viabilité et de prolifération cellulaires au XTT.....	60
2.4.8. Test d'activité antibactérienne.....	60
2.4.9. Evaluation de la compatibilité sanguine (tests d'hémocompatibilité)	61
a) Essais d'hémolyse.....	61
b) Test d'indice de coagulation sanguine (BCI).....	61
2.4.10. Études de cicatrisation <i>in vivo</i>	62
a) Essai de Heite-Marcy.....	62
b) Protocole expérimental.....	63
c) Analyse comparative de la progression de la cicatrisation des plaies.....	65
d) Examen histologique des processus de la régénération tissulaire.....	66
2.4.11. Analyse statistique.....	68

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Introduction.....	69
3.2. Caractérisation de la pectine amidée (AP).....	70
3.3. Caractérisation physicochimique des films élaborés.....	73
3.3.1. Détermination de la teneur en amines primaires libres et degré de réticulation.....	74
3.3.2. Analyse par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (IR-TF)	76
3.3.3. Analyse par diffraction des rayons X (DRX).....	79
3.3.4. Examen morphologique des films par MEB-EDX et MET.....	82
3.3.5. Analyse par microfluorescence X (micro-XRF)	84
3.3.6. Analyse mécanique des films d'hydrogel.....	85
3.3.7. Analyse thermique des films d'hydrogel.....	88
3.3.8. Evaluation de la capacité d'absorption de fluide, capacité de rétention d'eau et taux de transmission de vapeur d'eau des films d'hydrogel.....	89
3.4. Etude <i>in vitro</i> de la cinétique de libération d'argent à partir des films d'hydrogel.....	92
3.5. Evaluation de la cytocompatibilité des films d'hydrogel avec le test XTT.....	95
3.6. Activité antibactérienne des films d'hydrogel	97
3.7. Hémocompatibilité des films d'hydrogel	99

3.8. Activité cicatrisante <i>in vivo</i> des films d'hydrogel	101
3.8.1. Etude de la cinétique de cicatrisation cutanée	101
3.8.2. Observations macroscopiques des plaies.....	105
3.8.3. Etude histologique des processus de la régénération tissulaire.....	110
3.8.3.1. Observations histologiques	111
3.8.3.2. Discussion de l'étude histologique	116
CONCLUSION GENERALE	118
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 :	Classification des biopolymères en fonction de leurs sources.....	8
Figure 1.2 :	Représentation schématique des différents composants de la molécule de pectine et des différentes chaînes latérales de sucres neutres associées. Les sites de clivage des enzymes dégradant la pectine sont également représentés.....	13
Figure 1.3 :	Illustration graphique des principales méthodes d'extraction de la pectine.....	14
Figure 1.4 :	Classification de la pectine.....	18
Figure 1.5 :	Synthèse de la pectine amidée (AP) et du chitosane oxydé (OC), ainsi que la réticulation <i>in situ</i> par base de Schiff de l'hydrogel AP-OC.....	20
Figure 1.6 :	Formulation de la pectine-dopamine par oxydation périodate, amination réductrice, dopamine, et cyanoborohydrure de sodium.....	20
Figure 1.7 :	Méthode de fabrication de films par coulée au solvant.....	23
Figure 1.8 :	Différents types de techniques de polymérisation.....	24
Figure 1.9 :	Fonctionnalités de base du processus d'électrofilage.....	26
Figure 1.10 :	(a) Squelette de pectine constitué de (b) groupes carboxyliques, (c) ester et (d) amide.....	27
Figure 1.11 :	Exemples d'applications des hydrogels de pectine dans les formulations pharmaceutiques.....	35
Figure 1.12 :	(a) Photographies démontrant le développement de la cicatrisation des lésions chez des espèces animales présentant des excisions cutanées, répartis en différents groupes de traitement, ainsi que (b) le pourcentage de fermeture des plaies.....	41
Figure 1.13 :	Suivi de la rétention et de l'accumulation du médicament dans un hydrogel par imagerie NIRF après des injections intraveineuses et intratumorales de cypate ou de cypate/hydrogel à différents moments....	44

Figure 2.1 :	Illustration schématique du protocole expérimental de préparation des films d'hydrogels AP:GE@OTA/Ag.....	50
Figure 2.2 :	Schéma d'une cellule de Franz utilisée pour l'évaluation <i>in vitro</i> de la libération de l'argent.....	58
Figure 2.3 :	Illustration du modèle d'étude excisionnelle de Heite-Marcy.....	63
Figure 2.4 :	Schéma récapitulatif de l'étude <i>in vivo</i>	68
Figure 3.1 :	Spectres IR-FT (a) et diffractogrammes des rayons X (b) des échantillons de PE et AP.....	71
Figure 3.2 :	Spectres ¹ H-RMN des échantillons de PE et AP solubilisés dans D ₂ O....	72
Figure 3.3 :	Réaction d'amidation de la pectine.....	72
Figure 3.4 :	Images numériques des films d'hydrogel nanocomposites élaborés	73
Figure 3.5 :	Mécanisme réactionnel impliqué dans le processus de synthèse des films AP:GE@OTA/Ag.....	74
Figure 3.6 :	Effet de la concentration en OTA sur le nombre de groupes amine libres (●) ainsi que sur le degré de réticulation (■) dans les matrices polymériques.....	75
Figure 3.7 :	Spectres IR-TF de TA et d'OTA.....	76
Figure 3.8 :	Processus d'oxydation du TA par le biais du peroxyde d'hydrogène.....	77
Figure 3.9 :	Spectres IR-TF : (a) Films AP:GE@OTA5%/Ag préparés en l'absence et en présence d'OTA et de AgNPs ; (b) Films AP:GE@OTA/Ag avec différentes concentrations d'OTA.....	78
Figure 3.10 :	Les diffractogrammes de rayons X des films (a) AP:GE@OTA ; (b) AP:GE@OTA/Ag.....	80
Figure 3.11 :	(a) Micrographe MEB et spectre EDX du film AP:GE@OTA5%/Ag ; (b) Micrographie MET et distribution des tailles des AgNPs avec ajustement gaussien dans le film AP:GE@OTA5%/Ag.....	82
Figure 3.12 :	Résultats d'analyse micro-XRF validant l'incorporation et la	

	distribution homogène des AgNPs dans le film AP:GE@OTA5%/Ag....	85
Figure 3.13 :	Impact de la concentration en OTA sur les propriétés de traction et l'élongation à la rupture des films AP:GE@OTA/Ag.....	87
Figure 3.14 :	Thermogrammes TG et DTG des films AP:GE et AP:GE@OTA/Ag chauffés à une cadence de 10°C/minute sous une atmosphère azotée.....	88
Figure 3.15 :	Capacité d'absorption des fluides (a), capacité de rétention d'eau (b), et taux de transmission de vapeur d'eau (c) des formulations AP:GE@OTA/Ag.....	90
Figure 3.16 :	Profils de libération d'argent à partir des films élaborés dans un milieu FCS à 37°C, avec un pH de 7,4.....	93
Figure 3.17 :	(a) Evaluation de la viabilité cellulaire <i>in vitro</i> par le test XTT sur des cellules d'insulinome de souris NIT-1 après 72 h ; et (b) Morphologie cellulaire des cellules NIT-1 après 72 h de traitement avec des films élaborés à 100 µg/ml. Les images ont été capturées à l'aide d'un microscope à contraste de phase Nikon Eclipse Ts2 (Gx20)	96
Figure 3.18 :	Évaluation de l'activité antimicrobienne, par mesure de la zone d'inhibition, induite par les films élaborés contre <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	98
Figure 3.19 :	Indice de coagulation sanguine (BCI) des films AP:GE@OTA0.5%, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag, AP:GE@OTA5%/Ag et Hydrocoll®.....	100
Figure 3.20 :	Courbe d'évolution des surfaces des plaies en fonction du temps.....	103
Figure 3.21 :	Evolution comparative du taux de cicatrisation avec le temps pour AP:GE, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag et les témoins positifs (Hydrocoll®).....	104
Figure 3.22 :	Photos comparatives de l'évolution des plaies chez les rats traités avec AP:GE, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag et les témoins positifs (Hydrocoll®).....	106

Figure 3.23 :	Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie témoin traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (GX10)	111
Figure 3.24 :	Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0,5%/Ag. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (GX40)	111
Figure 3.25 :	Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (GX100)...	112
Figure 3.26 :	Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0,5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40)	112
Figure 3.27 :	Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0,5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX10)	113
Figure 3.28 :	Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le pansement AP:GE@OTA0.5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40)	113
Figure 3.29 :	Coupe histologique à J8 du tissu cicatriciel d'une plaie témoin traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration au trichrome de Masson. (GX10)	114
Figure 3.30 :	Coupe histologique à J8 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0,5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40).....	114
Figure 3.31 :	Coupe histologique à J12 du tissu cicatriciel d'une plaie témoin traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration au trichrome de Masson. (GX40)	115
Figure 3.32 :	Coupe histologique à J12 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration au trichrome de Masson. (GX40)	115
Figure 3.33 :	Coupe histologique à J12 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40)	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 :	Extraction de la pectine à partir de différentes sources et leurs rendements.....	15
Tableau 1.2 :	Revue bibliographique sur les renforcements des hydrogels à base de pectine.....	29
Tableau 1.3 :	Applications des hydrogels de pectine dans la libération de médicaments.....	37
Tableau 3.1 :	Nombre de moles de groupes amines libres dans les matrices polymériques, ainsi que le degré de réticulation.....	75
Tableau 3.2 :	Position angulaire et LMH du pic de diffraction des AgNPs, avec estimation de la taille des nanoparticules à partir des analyses DRX et MET.....	84
Tableau 3.3 :	Éléments métalliques contenus dans les films AP:GE@OTA/Ag, déterminés par analyse élémentaire en micro-fluorescence X (micro-XRF).....	84
Tableau 3.4 :	Propriétés mécaniques des films d'hydrogel AP:GE@OTA/Ag.....	86
Tableau 3.5 :	Chargement initiale en argent dans les formulations AP:GE@OTA/Ag..	93
Tableau 3.6 :	Paramètres cinétiques obtenus par ajustement à plusieurs modèles cinétiques mathématiques du profil de libération de l'argent dans le FCS à 37°C, pH 7,4.	95
Tableau 3.7 :	Test hémolytique des globules rouges humains (HRBCs) après traitement avec de l'eau distillée, une solution PBS, des films élaborés pendant 2 heures.....	100
Tableau 3.8 :	Récapitulatif des mesures quotidiennes des surfaces (mm ²) des plaies excisionnelles réalisées avec un emporte-pièce de 3 mm de diamètre.....	102
Tableau 3.9 :	Récapitulatif des taux de cicatrisation (%) dans le temps pour les 4 lots. AP:GE, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag et témoin positif (Hydrocoll®).....	103
Tableau 3.10 :	Récapitulation de la symptomatologie développée par les rats au cours du processus de cicatrisation des plaies excisionnelles.....	106

LISTE DES ABREVIATIONS

ACD : acide citrate dextrose
BCI : indice de coagulation sanguine
AgNPs : nanoparticules d'argent
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens
AP : pectine amidée
βGP : bêta-glycérophosphate
BSA : albumine bovine
CA4 : combretastatine A4 phosphate disodique
CEC : chitosane carboxyéthylé
CLSM : microscopie confocale à balayage laser
CMFs : microfibrilles de cellulose cristalline
CMC : carboxyméthylcellulose
CNC : nanocristal de cellulose
CPE : composites polymères écologiques
DA : degré d'amidation
DE : degré d'estérification
DMAA : diméthacrylamide
DMMA : diméthylacrylamide
DOX : chlorhydrate de doxorubicine
EAE : extraction assistée par enzymes
ECs : cellules endothéliales
EDC/NHS : carbodiimide/N-hydroxysuccinimide
F : degré de réticulation
FBS : sérum de veau fœtal
FCS : fluide corporel simulé
GA : gomme arabique
GalA : acide galacturonique
GAGs : glycosaminoglycanes
GE : gélatine
GelMA : gélatine méthacryloyl
GelMA : méthacrylate de gélatine

GP : gélatine greffée de polypyrrole
GTA : glutaraldéhyde
GRH : globules rouges humains
HBHP-3 : pectine de *Houttuynia cordata*
HG : homogalacturonane
HMP : pectine à forte teneur en méthoxyle
H&E : Hématoxyline-Éosine
IPN : réseau polymère interpénétrant
κC : kappa-carraghénane
LMH : largeur à mi-hauteur
LMP : pectine à faible teneur en méthoxyle
MEC : matrice extracellulaire
MAE : extraction assistée par micro-ondes
MMP : pectine à forte moyenne en méthoxyle
mEGF : facteur de croissance épidermique modifié
MSCs : cellules souches mésenchymateuses
NAR : naringine
NIRF : imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge
NO : oxyde nitrique
OCMC : carboxyméthylcellulose oxydée
OPC : pectine oxydée
OTA : acide tannique oxydé
PE : pectine commerciale
PE : pectinestérase
PLA : acide polylactique
PHBV : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)
PHA : polyhydroxyalcanoates
PHB : polyhydroxybutyrate
PCL : polycaprolactone
PGA : acide polyglycolique
PG : polygalacturonase
PL : pectate lyase
PME : pectine méthylestérase
PCL : polycaprolactone

PECMA : pectine méthacryloyl

PVA : alcool polyvinylique

PECMA : méthacrylate de pectine

Pectin-g-PCL : copolymère greffé de pectine-polycaprolactone

PGA : acide polygalacturonique

PLLA : poly(L-lactide) aminolysé

P(NIPAM-stat-AH) : copolymère d'acylhydrazide et de N-isopropylacrylamide

PEI : polyéthylèneimine

PBS : tampon phosphate saline

PH : pourcentage d'hémolyse

QCS : chitosane quaternisé

RG-I : rhamnogalacturonane I

RGD : arginine-glycine-acide aspartique

SIF : fluide intestinal simulé

SAAFG : spectromètre d'absorption atomique à four graphite

TA : acide tannique

TEOS : orthosilicate de tétraéthyle

TEP : orthosilicate de tétraéthyle **UAE** : extraction assistée par ultrasons

TNBS : acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzène

TH : taux d'humidité

UMAE : extraction assistée par ultrasons et micro-ondes

VSMCs : cellules musculaires lisses vasculaires

WVTR : taux de transmission de vapeur d'eau

XTT : methoxynitrosulfophenyl-tetrazolium carboxanilide

ZnO : oxyde de zinc

INTRODUCTION GENERALE

Les pansements conventionnels, tels que les compresses et les bandages, dominent encore les pratiques cliniques grâce à leur accessibilité et simplicité d'utilisation. Toutefois, leur efficacité hémostatique s'avère insuffisante dans le traitement des plaies complexes, notamment celles de formes irrégulières et profondes [1-3]. Un pansement idéal doit répondre à divers critères pour garantir une cicatrisation efficace et sûre. Ces critères incluent : une adaptation morphologique aux plaies complexes, une protection mécanique adéquate, la capacité à maintenir un environnement humide, une perméabilité optimale aux gaz, une absorption efficace des exsudats, une protection contre les infections bactériennes, et la facilité de retrait sans douleur, tout en étant biocompatible et biodégradable [4-7].

Le développement de nouveaux pansements à haute performance, capables de satisfaire ces exigences, constitue une priorité dans la recherche des matériaux médicaux. Parmi les avancées récentes, les hydrogels se démarquent par leur capacité à répondre à de nombreux critères requis pour le soin des plaies [8, 9]. En tant que réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles, les hydrogels peuvent absorber de grandes quantités d'eau [10], reproduisant ainsi des propriétés similaires à la matrice extracellulaire (MEC), ce qui les rend largement utilisés dans des applications pharmaceutiques et biomédicales. Ces hydrogels multifonctionnels ne se contentent pas d'agir comme barrières physiques et absorbants d'exsudats ; ils servent également de réservoirs de molécules bioactives et maintiennent un environnement humide favorable à la cicatrisation [11, 12].

De plus, les hydrogels injectables sont particulièrement adaptés pour combler les plaies irrégulières et traiter efficacement les plaies hémorragiques profondes [13, 14]. L'essor des hydrogels dans le domaine des soins des plaies a conduit à la commercialisation de divers produits, tels que l'Algisite M, le pansement hydrocolloïde Tegaderm™, Evicel®, et Coseal®. Malgré leur efficacité, ces produits présentent des limitations, comme un coût élevé, des exigences de stockage strictes, une protection mécanique parfois insuffisante et une perméabilité aux gaz souvent inadaptée [15]. Pour surmonter ces défis, la recherche se tourne vers le développement des films d'hydrogels biocompatibles et biodégradables, combinant des propriétés physico-chimiques

optimales, des caractéristiques mécaniques robustes, et une excellente capacité de rétention des fluides physiologiques tout en étant cytocompatibles, hémostatiques, et dotés de propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes [16]. Ces fonctionnalités visent non seulement à favoriser la cicatrisation, mais aussi à permettre une surveillance en temps réel des paramètres biologiques au niveau de la plaie [17] et à offrir également une protection renforcée contre les infections bactériennes, tout en réduisant les délais et les coûts de fabrication [18].

Les biopolymères se distinguent par leur faible toxicité, leur bioactivité et leur capacité à former des gels, ce qui en fait des candidats privilégiés pour la fabrication de films hydrogels [19]. Les réseaux polymères tridimensionnels réticulés offrent des propriétés physico-mécaniques similaires à celles des tissus humains, tout en maintenant efficacement un environnement humide autour de la plaie [20]. Cependant, les hydrogels composés d'un seul polymère présentent souvent une dégradation rapide et une capacité d'absorption limitée. De plus, la plupart des polymères isolés manquent de propriétés antibactériennes suffisantes pour prévenir les infections dans les plaies partiellement cicatrisées [21]. Pour pallier ces insuffisances, des substances bioactives et des agents de réticulation sont incorporés dans les systèmes hydrogels, améliorant ainsi leurs propriétés mécaniques et antibactériennes [22].

La pectine, un biopolymère naturellement présent dans de nombreux fruits et légumes, est largement exploitée pour ses propriétés polyvalentes et biocompatibles, qui en font un ingrédient clé dans diverses applications pharmaceutiques. En cicatrisation des plaies, la pectine favorise la formation de films protecteurs hydratants, créant ainsi un environnement propice à la guérison. Dans l'administration de médicaments, elle agit comme un agent de libération contrôlée, permettant une diffusion prolongée et ciblée des substances actives. Sa capacité à former des gels en milieu aqueux, combinée à ses excellentes propriétés d'adhésion et de bioactivité, en fait un matériau de choix pour les pansements et les systèmes avancés de délivrance de médicaments, optimisant ainsi la protection et la régénération des tissus [23]. Toutefois, la pectine présente des limitations, notamment sa faible stabilité thermique et mécanique, qui nécessitent son association avec d'autres biopolymères pour améliorer ses performances. Parmi les polymères naturels couramment utilisés en renforcement, la gélatine se distingue par son efficacité à améliorer les propriétés mécaniques et thermiques des hydrogels, permettant de créer des matériaux plus robustes et efficaces. Diverses modifications physicochimiques de la

pectine, telles que la photo-réticulation [24], la formation de base de Schiff [25] et l'incorporation d'agents bioactifs [26], ont également été étudiées pour renforcer ses propriétés antibactériennes contre diverses souches, accélérant ainsi le processus de cicatrisation des plaies. De plus, la gélatine, en raison de sa similitude chimique avec la matrice extracellulaire, favorise la régénération tissulaire [27], mais sa faible résistance mécanique requiert l'ajout d'agents de réticulation pour renforcer le réseau polymérique, augmentant ainsi la durabilité du matériau en milieu biologique [28].

Parmi les agents de réticulation chimiques classiques, le glutaraldéhyde, les carbodiimides et les composés polyépoxy sont efficaces, mais ils peuvent générer des résidus toxiques compromettant la biocompatibilité des hydrogels [29]. En réponse à ces défis, les agents de réticulation naturels, tels que l'acide tannique (TA), ont suscité un intérêt croissant en raison de leur biocompatibilité, de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes [30]. De plus, la forme oxydée de l'acide tannique (OTA) se distingue par sa capacité à former des liaisons covalentes avec les groupes fonctionnels des biopolymères, renforçant ainsi l'intégrité mécanique et la stabilité des hydrogels [31]. Par ailleurs, l'OTA présente également des propriétés de chélation des métaux [32], permettant une interaction avec les nanoparticules, telles que celles d'argent, afin d'assurer une dispersion homogène et d'améliorer l'activité antibactérienne des hydrogels

Malgré les avancées notables dans le domaine des hydrogels pour les soins des plaies, l'infection bactérienne reste un défi majeur à surmonter. L'incorporation de nanoparticules d'argent (AgNPs) dans les films hydrogels fait l'objet de nombreuses études en raison de leur capacité à renforcer l'activité antibactérienne et à prévenir les infections au niveau des plaies [33].

Dans ce contexte, la présente thèse vise à développer un film hydrogel antibactérien innovant, à base de pectine amidée (AP) et de gélatine (GE), réticulé avec de l'acide tannique oxydé (OTA) et enrichi de nanoparticules d'argent (AgNPs). Cette recherche se concentre sur l'exploration des mécanismes de réticulation covalente, notamment les réactions de formation de bases de Schiff et de coordination métallique, dans le but d'optimiser les propriétés mécaniques, thermiques et de résistance à la perméabilité du matériau, tout en conférant à celui-ci des caractéristiques antibactériennes efficaces. L'un des objectifs principaux de cette étude est d'assurer une dispersion homogène des nanoparticules d'argent dans la matrice polymérique, afin d'éviter leur aggrégation

indésirable et de minimiser leur cytotoxicité. Pour ce faire, une méthode de réduction in-situ utilisant l'acide tannique oxydé, agissant à la fois comme agent réducteur et stabilisant naturel, sera mise en œuvre. Cette approche permet de produire des nanoparticules d'argent de taille contrôlée et uniformément dispersées dans le réseau polymérique de l'hydrogel. Les propriétés de l'hydrogel développé pourront être modulées en fonction du degré de réticulation, permettant ainsi une adaptation fine aux exigences spécifiques des soins des plaies. Par ailleurs, l'hydrogel ainsi formulé offrira une libération contrôlée des principes actifs par voie transdermique, réduisant les risques toxicologiques souvent associés à l'utilisation de nanoparticules dans les applications biomédicales. Ces travaux ouvrent des perspectives prometteuses pour des avancées innovantes dans le domaine des soins des plaies, apportant une contribution significative à l'amélioration des dispositifs de traitement des plaies infectées et complexes.

Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres principaux. Le premier chapitre offre une revue bibliographique exhaustive, qui examine les biopolymères et présente un état de l'art des hydrogels à base de biopolymères. Il met en évidence les propriétés intrinsèques de ces matériaux, qui suscitent un intérêt croissant dans le domaine biomédical, notamment en raison de leurs applications prometteuses dans la libération contrôlée de médicaments. De plus, ce chapitre explore en détail les diverses méthodes de synthèse et les stratégies de modification utilisées pour améliorer leurs performances dans des contextes thérapeutiques. Le deuxième chapitre décrit avec précision les matériaux, les produits, ainsi que les méthodes expérimentales adoptées au cours de cette étude. Le troisième et dernier chapitre présente les résultats obtenus lors de la préparation du film d'hydrogel antibactérien. Il comprend une analyse approfondie de la caractérisation physico-chimique des films d'hydrogel préparés, ainsi que leur évaluation microbiologique et biologique. Les résultats sont accompagnés d'interprétations détaillées et de discussions critiques, permettant d'évaluer l'efficacité et les potentialités du pansements antibactériens développés. Enfin, cette thèse se conclut par une synthèse générale des résultats, ouvrant la voie à des recommandations pour les recherches futures. Des perspectives sont avancées pour explorer de nouvelles pistes en vue de l'optimisation des hydrogels pour les applications biomédicales.

CHAPITRE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction :

Les récentes avancées dans la fabrication de matériaux fonctionnels témoignent d'une volonté croissante de préserver un environnement propre, tout en diminuant la dépendance aux combustibles fossiles. Cette dynamique a encouragé d'importants efforts de recherche pour développer des alternatives aux matériaux issus du pétrole, en se concentrant sur des solutions biodégradables, provenant de ressources biologiques et renouvelables. Parmi ces alternatives, les biopolymères se distinguent grâce à leurs qualités remarquables, notamment leur biodégradabilité et leur non toxicité. Ces atouts font des biopolymères des matériaux particulièrement adaptés pour répondre aux enjeux environnementaux actuels liés à l'utilisation des polymères conventionnels [1].

La demande pour des matériaux biocompatibles a également favorisé le développement de biopolymères dérivés de ressources renouvelables. Ceux-ci présentent non seulement des avantages en termes de biocompatibilité, mais également de bonnes propriétés mécaniques, rendant ces polymères adaptés à de nombreuses applications biomédicales [2]. De plus, les procédés de synthèse et de transformation respectueux de l'environnement des biopolymères contribuent à réduire leur impact écologique global. Ces matériaux se positionnent ainsi comme des solutions prometteuses dans des domaines tels que l'ingénierie tissulaire et l'administration de médicaments, tout en soutenant une approche durable [3].

Les matériaux dérivés du pétrole, malgré leur omniprésence dans l'automobile, l'aérospatiale et la médecine, posent de nombreux problèmes écologiques et économiques. Leurs prix ont grimpé avec les fluctuations du marché mondial du pétrole, passant de 10 USD par baril en 1998 à 146 USD en 2008. Ces augmentations de coût affectent directement la production de polymères à base de pétrole [4]. Les biopolymères, en revanche, offrent une alternative stable et moins volatile, tant sur le plan écologique qu'économique [5].

Par ailleurs, le marché des biopolymères pour l'emballage continue de croître rapidement. Il devrait atteindre une valeur de 89,29 milliards USD d'ici 2032, ce qui représente un taux de croissance annuel de 6,4 % durant la période de prévision. De même, dans le secteur pharmaceutique, le marché des biopolymères a connu une croissance d'environ 17 % entre 2017 et 2021, atteignant une valeur estimée de 10 milliards USD [6]. Néanmoins, la compétitivité des coûts reste un défi majeur pour la production de biopolymères renouvelables, en particulier par rapport aux carburants fossiles [7]. Certains procédés, comme la production de biocarburants à partir d'algues dans des climats froids, nécessitent des investissements initiaux importants [8].

La recherche actuelle se concentre sur des solutions respectueuses de l'environnement, biodégradables et issues de ressources renouvelables, dans l'optique de remplacer les matériaux conventionnels [11]. L'intégration de la chimie verte et de l'ingénierie moderne est essentielle pour la création des matériaux innovants, ce qui soutient une économie circulaire et durable, en valorisant les sources naturelles et les déchets [12].

1.2. Généralités sur les biopolymères :

Les biopolymères sont des polymères dont le préfixe « bio » renvoie à leur origine naturelle, étant produits par des organismes vivants. Ils sont composés d'unités monomériques telles que les acides nucléiques, les saccharides ou les acides aminés, formant des structures moléculaires linéaires ou ramifiées [34]. Actuellement, les biopolymères sont de plus en plus utilisés dans plusieurs secteurs industriels, grâce à leurs caractéristiques remarquables : biocompatibilité, non-toxicité, biodégradabilité, durabilité et faible impact environnemental. Ces polymères sont qualifiés de biodégradables car ils proviennent directement de sources naturelles, ce qui leur confère un atout économique majeur sur le marché [35]. Les biopolymères trouvent des applications dans des secteurs variés tels que les emballages alimentaires intelligents, les ingrédients alimentaires, l'agriculture, les dispositifs biomédicaux, les implants dentaires et les produits d'hygiène. Toutefois, leur production reste coûteuse, incitant les chercheurs à optimiser les procédés de fabrication en sélectionnant des substrats économiques, en utilisant des micro-organismes à haut rendement et en améliorant les techniques de purification afin de réduire les coûts [36].

1.2.1. Sources des biopolymères :

Les biopolymères sont issus de multiples sources naturelles, incluant les animaux, les végétaux et les micro-organismes (en particulier les algues) ainsi que des déchets agricoles [37]. Parmi les principales ressources agricoles figurent des cultures comme les pommes de terre, le blé, le coton, le maïs, le manioc et le riz. Du côté animal, le porc et le bétail fournissent également des matières premières [35]. La biomasse inclut non seulement les résidus agricoles mais aussi les déchets de bois et de papier. Les sources marines, quant à elles, comprennent des organismes tels que les poissons, les homards et les coraux. Les micro-organismes comme les algues, occupent une place cruciale dans l'économie circulaire, en particulier en contribuant à la diminution des émissions de gaz à effet de serre [37]. Par ailleurs, les huiles végétales riches en triglycérides – issues du soja, du maïs et du tournesol – peuvent être transformées en monomères en présence de co-monomères et de catalyseurs appropriés [35, 38].

1.2.2. Classification des biopolymères :

Les biopolymères peuvent être catégorisés selon divers critères. En tenant compte de leur biodégradabilité, ils se divisent en biopolymères biodégradables et non biodégradables, tandis que selon leur origine, ils proviennent soit de sources naturelles, soit de combustibles fossiles. En fonction de leur réponse thermique, on distingue les élastomères, les thermoplastiques et les thermodurcissables. Enfin, selon leur composition, ils se regroupent en mélanges, laminés ou composites [13].

Une classification répandue repose sur la source des matières premières, divisant les biopolymères en trois grandes catégories : naturels, synthétiques et microbiens. Les biopolymères naturels, extraits de la biomasse, comprennent des polymères dérivés des protéines et des polysaccharides. Parmi les biopolymères protéiques d'origine végétale et animale, on trouve l'alginate, les kératines, le collagène, l'élastine, la zéine, la gélatine, la fibrinogène, le gluten de blé, ainsi que les protéines de soja, de lait, d'œuf et de lactosérum. Du côté des polysaccharides, les sources dérivées de glucides incluent la cellulose, l'agar, les galactanes, les pectines, le carraghénane, l'acide alginique, la chitine, l'acide hyaluronique, les gommes et l'amidon [18, 19]. La classification des polymères issus des polysaccharides et des protéines est décrite dans la Figure 1.1. Les polymères synthétiques, tels que l'acide polylactique (PLA), sont synthétisés chimiquement à partir de la biomasse. Les biopolymères issus de la production microbienne incluent le

poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), les polyhydroxyalcanoates (PHA), le polyhydroxybutyrate (PHB), le levane, le gellan, le dextrane, ainsi que la cellulose bactérienne. Enfin, les polysaccharides microbiens se subdivisent en exopolysaccharides, polysaccharides capsulaires et xanthane. Ces biopolymères ont des applications variées dans les domaines médical, agricole, agro-industriel et environnemental [15, 19-21].

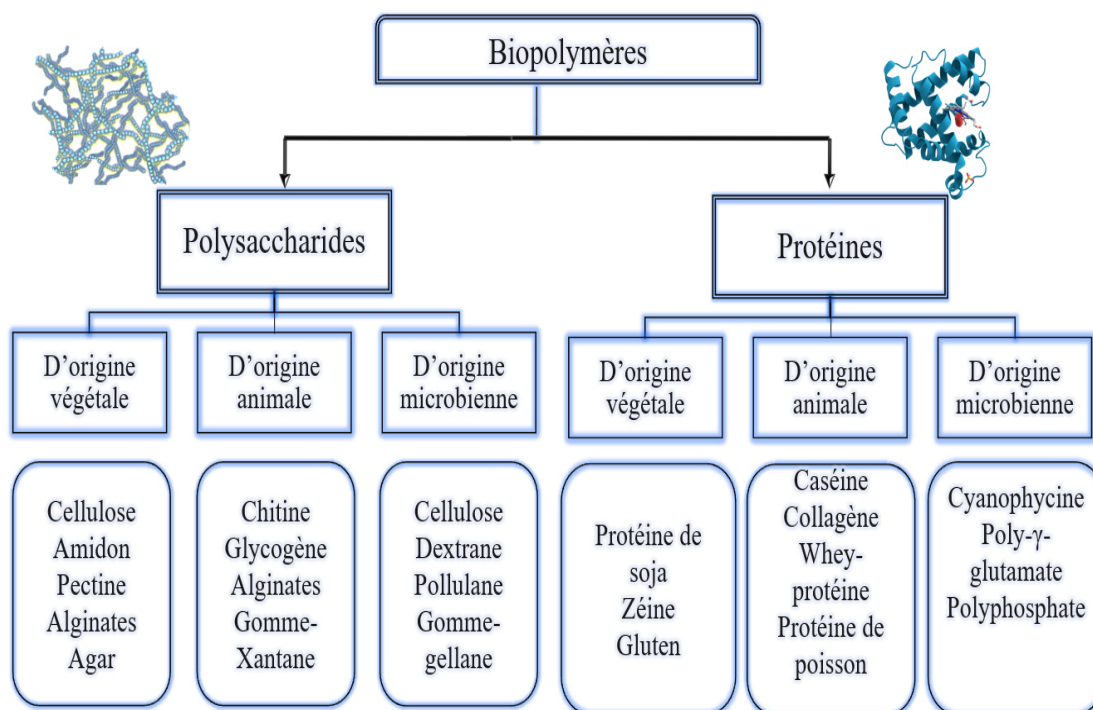


Figure 1.1 : Classification des biopolymères en fonction de leurs sources [39].

1.2.3. Propriétés des biopolymères :

1.2.3.1. La non-toxicité des biopolymères :

La non-toxicité des biopolymères naturels les rend particulièrement adaptés pour divers secteurs, notamment les applications biomédicales, l'industrie alimentaire, l'emballage et les technologies environnementales. Cette caractéristique provient de leur compatibilité physiologique et de leur origine naturelle, leur permettant de ne pas nuire aux organismes vivants ni à l'environnement lors de leur élimination ou dégradation. Les biopolymères naturels sont souvent issus de substances présentes dans les systèmes biologiques, comme la cellulose des plantes ou la gélatine extraite du collagène animal. Leur compatibilité avec les systèmes biologiques justifie leur large utilisation dans les domaines médical et alimentaire [40]. Contrairement aux polymères synthétiques, les

biopolymères naturels se décomposent en sous-produits inoffensifs tels que la biomasse, le dioxyde de carbone et l'eau, grâce à l'action d'enzymes ou de micro-organismes, ce qui réduit le risque de pollution plastique persistante [41].

Les biopolymères naturels ont également un faible potentiel de déclencher des réactions immunitaires indésirables, un avantage crucial pour les implants et produits en contact direct avec la peau ou les membranes muqueuses [42]. De nombreux biopolymères sont reconnus comme étant "Generally Recognized as Safe" (GRAS) par la FDA, confirmant leur sûreté dans les applications médicales et alimentaires. Étant donné que les biopolymères naturels sont dérivés de sources biologiques, ils ne contiennent pas d'éléments cancérogènes liés à la synthèse et la dégradation de certains polymères synthétiques [42, 43]. Des études et des tests approfondis ont validé leur non toxicité dans les applications prévues, notamment dans le domaine médical où ils aident à minimiser la réponse de corps étranger et à éviter la libération de substances toxiques lors de leur dégradation dans l'organisme.

1.2.3.2. La biocompatibilité des biopolymères :

Les biopolymères naturels sont largement reconnus pour leur biocompatibilité, en raison de leur compatibilité intrinsèque avec les systèmes biologiques [43, 44]. Leur similitude avec les composants présents dans le corps les rend exempts d'effets toxiques [45]. Comparés aux biopolymères synthétiques, les biopolymères naturels induisent souvent une réponse immunitaire plus faible, car le corps les reconnaît comme des substances familières en raison de leur origine biologique [46]. De plus, leurs produits de dégradation sont non toxiques et peuvent être métabolisés ou excrétés sans danger, contrairement à certains matériaux synthétiques qui peuvent libérer des sous-produits nocifs [43]. Ces matériaux sont capables de soutenir l'adhésion, la croissance et la prolifération cellulaire, des propriétés essentielles en ingénierie tissulaire et médecine régénérative. De plus, les polymères naturels, quand ils entrent en contact avec le sang, ne déclenchent pas de coagulation ni d'autres réactions indésirables, ce qui les rend particulièrement adaptés pour des applications comme les stents, greffons vasculaires et autres dispositifs en contact avec le sang [46].

Certains biomatériaux naturels favorisent aussi les processus de guérison, d'où leur utilisation dans les pansements, les échafaudages de régénération tissulaire, ou comme systèmes de libération de médicaments [47]. En étant dégradés par les enzymes du corps,

ces matériaux présentent un taux de dégradation prévisible, en accord avec les besoins de la régénération tissulaire [46]. Cependant, la biocompatibilité des biopolymères naturels doit toujours être validée pour chaque application spécifique, avec des tests rigoureux *in vitro* et *in vivo*, afin de garantir l'absence d'effets indésirables. Certains biopolymères naturels possèdent aussi des propriétés bioactives qui encouragent des interactions biologiques favorables, réduisant ainsi les risques de réactions à corps étranger [48]. Leurs produits de dégradation, souvent reconnus par le corps comme naturels, sont métabolisés sans effets nocifs [49]. Leur ressemblance structurelle avec les composants de la matrice extracellulaire du corps contribue à leur intégration harmonieuse, réduisant ainsi les réactions indésirables [49]. Des matériaux tels que le collagène et la chitine ont démontré une longue histoire d'utilisation médicale, avec des données solides montrant leur faible risque de provoquer des réactions à corps étranger [50]. Toutefois, il est essentiel de reconnaître que les réponses individuelles peuvent varier, et que certaines réactions peuvent survenir selon le patient et l'application spécifique.

1.2.3.3. La biodégradabilité des biopolymères :

Les biopolymères d'origine naturelle, tels que la cellulose, la pectine, la chitine, l'alginate et les protéines comme le collagène ou la gélatine, présentent généralement une forte biodégradabilité, car ils proviennent de ressources renouvelables [24]. Dans des environnements naturels ou dans des conditions optimales de compostage, ces matériaux sont efficacement décomposés par les micro-organismes. En revanche, les polymères biodégradables synthétiques sont conçus pour se dégrader progressivement par des mécanismes chimiques et physiques. Des exemples de polymères tels que l'acide polylactique (PLA), la polycaprolactone (PCL) et l'acide polyglycolique (PGA) possèdent des propriétés biodégradables, souvent en raison de la présence de liaisons esters sujettes à l'hydrolyse. Le processus de biodégradation débute par une biodétérioration, au cours de laquelle les caractéristiques physiques, chimiques et mécaniques du matériau sont altérées. Ensuite, le matériau se fragmente en particules plus petites, puis est assimilé par les micro-organismes via leurs processus métaboliques [51].

Dans les applications biomédicales, comme les sutures ou les échafaudages pour l'ingénierie tissulaire, la biodégradabilité est cruciale pour garantir que le matériau soit absorbé par le corps de manière contrôlée après avoir rempli sa fonction, évitant ainsi une intervention chirurgicale pour son retrait. De plus, la biodégradabilité des biopolymères

contribue à réduire la pollution et les défis liés à la gestion des déchets des plastiques traditionnels non dégradables. Les polymères biodégradables, lorsqu'ils sont correctement conçus, permettent de limiter l'empreinte écologique en assurant une décomposition complète, que ce soit dans des installations de compostage ou dans des environnements naturels.

1.2.3.4. Les propriétés mécaniques des biopolymères :

Les propriétés mécaniques d'un matériau dépendent en grande partie de sa réponse à des conditions essentielles telles que la température, les vitesses de chauffage et de refroidissement, la force appliquée et le taux de déformation. Dans le cas des biopolymères, la configuration des chaînes polymériques et les interactions entre les unités monomères, ainsi que la composition chimique, la cristallinité, la morphologie, le poids moléculaire, le degré de réticulation, l'orientation moléculaire, la copolymérisation, la plastification et la concentration en agents de renforcement, influencent directement des propriétés mécaniques clés telles que la résistance à la traction, la flexibilité et la rigidité [52]. Ces facteurs déterminent la performance des biopolymères face à différentes sollicitations mécaniques et permettent d'ajuster leurs fonctionnalités pour une large gamme d'applications, notamment dans les emballages biodégradables, les implants médicaux et les échafaudages utilisés en ingénierie tissulaire.

Les biopolymères représentent une alternative idéale aux polymères synthétiques dérivés du pétrole [53]. Toutefois, leurs propriétés intrinsèques, notamment leur résistance aux chocs, leur résistance en traction, leur perméabilité et leur stabilité thermique, restent limitées. L'une des stratégies les plus prometteuses pour améliorer ces caractéristiques et renforcer leur viabilité commerciale consiste à incorporer des matériaux de renforcement à l'échelle micro- ou nanométrique dans la matrice de biopolymères. Les composites obtenus, souvent appelés composites polymères écologiques (CPE) ou composites de biopolymères, offrent ainsi des propriétés mécaniques et thermiques améliorées [54, 55]. Ces composites multifonctionnels s'illustrent par une large gamme d'applications de nouvelle génération, couvrant des secteurs variés tels que la médecine, l'électronique, l'emballage et l'automobile. Il a été démontré que l'incorporation de matériaux de renforcement biosourcés dans les biopolymères améliore de manière significative les propriétés mécaniques des composites obtenus, notamment en augmentant la résistance en traction et la résistance aux impacts

[56]. Les biopolymères renforcés par des nanoparticules et nanofibres naturelles présentent également une amélioration du module de rigidité, une réduction de la perméabilité aux gaz, une augmentation de la température de déformation thermique et une biodégradabilité accrue. Parmi les propriétés mécaniques, la résistance en traction est l'une des caractéristiques les plus fréquemment étudiées pour les composites à base de biopolymères [54].

Actuellement, la demande pour ces biomatériaux innovants ne cesse de croître, en grande partie en raison de leur caractère écologique et de leur coût inférieur par rapport aux matériaux traditionnels, comme les fibres de carbone, d'aramide ou de verre [57]. Les composites de polymères biosourcés font l'objet de nombreuses études publiées chaque année [58-60]. Leur développement continu est motivé par leurs excellentes propriétés mécaniques, leur compatibilité biologique remarquable et leur capacité à se biodégrader, ouvrant la voie à de nouvelles applications respectueuses de l'environnement.

1.3.Aperçu sur la pectine en tant que biopolymère :

1.3.1. Origine, structure et techniques modernes d'extraction de la pectine

La pectine est un hétéropolysaccharide ramifié, composé de segments de galacturonane et de sucres neutres comme le rhamnose, l'arabinose, le galactose et le xylose. Elle joue un rôle essentiel dans la structure cellulaire en formant une matrice avec la cellulose et l'hémicellulose. En tant que polysaccharide hydrophile des membranes cellulaires végétales, elle est constituée de chaînes linéaires d'acide α -D-galacturonique liées en (1 $\rightarrow$ 4). Une partie des groupes carboxyliques de la chaîne de galacturonane est méthylée, et le degré de méthylation (exprimé en pourcentage des carboxyles estérifiés) est crucial pour classer les pectines. La Figure 1.2 représente les différents composants de la molécule de pectine ainsi que les différentes chaînes latérales de sucres neutres associées la structure de la pectine.

Dans les parois cellulaires primaires des plantes, la pectine assure l'intégrité structurelle et la flexibilité tout en régulant la croissance cellulaire sous pression de turgescence. Les microfibrilles de cellulose cristalline (CMFs), intégrées dans une matrice de pectine, xyloglucane et protéines endogènes, influencent les propriétés mécaniques globales de la paroi cellulaire par leurs interactions mutuelles [61, 62].

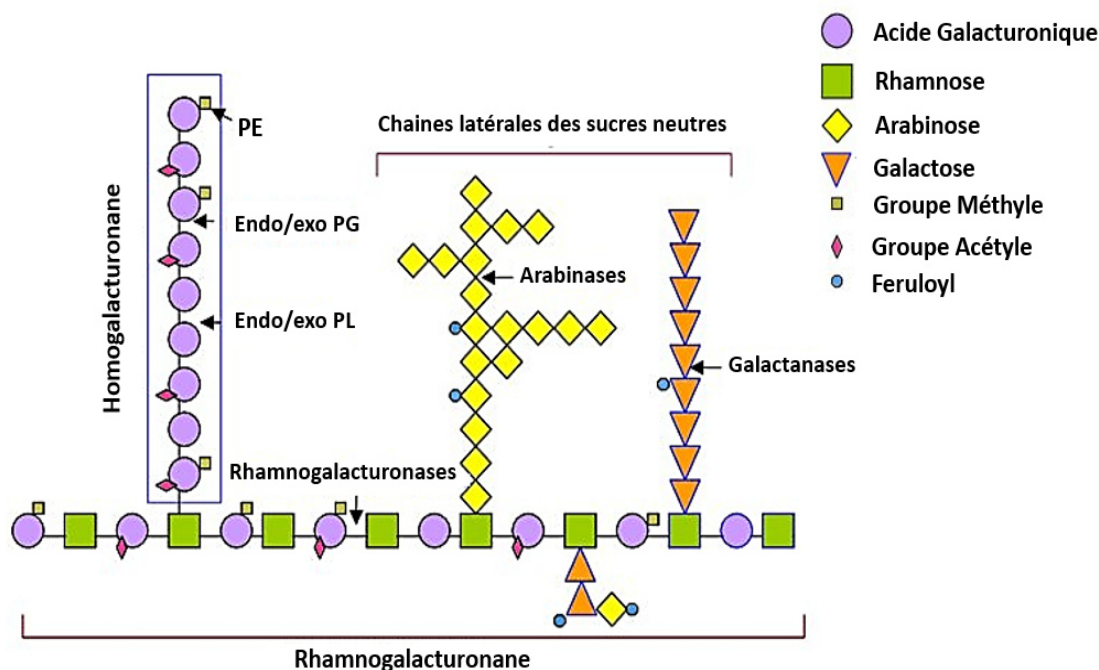


Figure 1.2 : Représentation schématique des différents composants de la molécule de pectine et des différentes chaînes latérales de sucres neutres associées. Les sites de clivage des enzymes dégradant la pectine sont également représentés [63].

Utilisée dans l'industrie alimentaire et les secteurs pharmaceutiques et médical, la pectine est intégrée dans des films comestibles et des revêtements pour prévenir la contamination microbienne des fruits et légumes et réguler l'échange d'humidité, de gaz et de composés volatils entre les aliments et leur environnement [64, 65]. Les pectines des agrumes et des pommes sont les plus courantes, le marc de pomme contenant 10 à 15 % de pectine, tandis que l'écorce d'agrumes en contient 20 à 30 %. D'autres sources incluent des sous-produits comme les têtes de tournesol, les écorces de mangue et de banane, ou encore les enveloppes de pois chiches [65]. De nombreuses techniques d'extraction ont été mises au point afin d'optimiser les paramètres opératoires en fonction des caractéristiques spécifiques des sources végétales de pectine. Ces méthodes visent à maximiser le rendement, la pureté et les propriétés fonctionnelles de la pectine extraite, en ajustant des variables telles que le pH, la température, le temps d'extraction et le type de solvant. La Figure 1.3 présente une synthèse des principales méthodes d'extraction de la pectine à partir de différentes sources végétales, illustrant les approches chimiques, enzymatiques et physiques couramment employées.

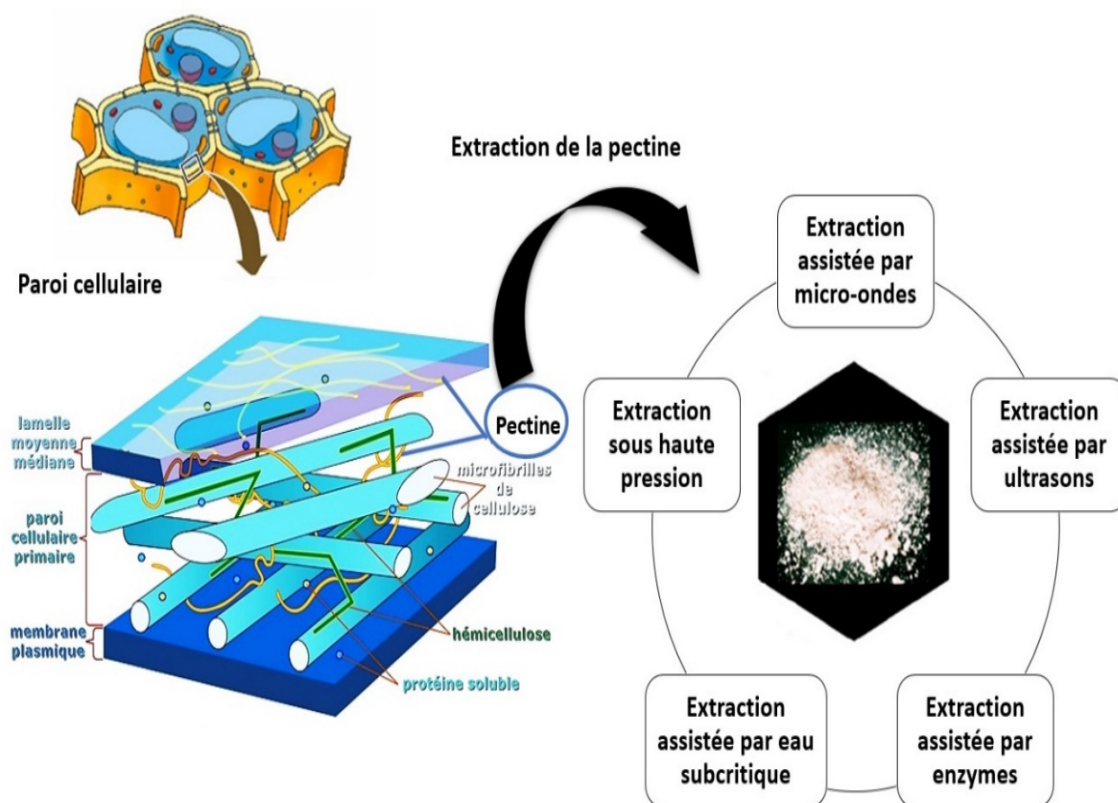


Figure 1.3 : Illustration graphique des principales méthodes d'extraction de la pectine.

Parmi les méthodes modernes d'extraction les plus couramment utilisées pour obtenir de la pectine tout en préservant sa structure chimique et sa composition originale et pour éviter la contamination environnementale, on distingue l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction combinée assistée par ultrasons et micro-ondes (UMAE), ainsi que l'extraction assistée par enzymes (EAE). Ces techniques présentent l'avantage d'améliorer l'efficacité et le rendement de l'extraction par rapport aux méthodes conventionnelles, en réduisant notamment les temps de traitement et la consommation de solvants. L'extraction par ultrasons utilise des ondes acoustiques pour créer des vibrations qui favorisent la rupture des parois cellulaires, tandis que l'extraction par micro-ondes repose sur l'irradiation des échantillons pour générer une chaleur interne rapide. L'approche combinée (UAE-MAE) exploite les synergies entre ces deux techniques, tandis que l'extraction enzymatique (EAE) fait appel à des enzymes spécifiques qui dégradent sélectivement les structures végétales, facilitant ainsi la libération plus ciblée et efficace de la pectine. Dans le tableau suivant, nous présentons les résultats de l'optimisation du rendement d'extraction de la pectine à partir de diverses sources végétales, en appliquant ces différentes méthodes.

Tableau 1.1. Extraction de la pectine à partir de différentes sources et leurs rendements.

Sources de pectine	Méthodes d'extraction	Rendement en pectine	Référence
Marc de pomme	MAE	23.32 %	[66]
Peau de mangue	UAE	17.15 %	[67]
Fruit de la passion	EAE	17.91 %	[68]
Orange amère	UAE	28.07 %	[69]
Jacquier	UMAE	21.5 %	[70]
Fruit du dragon	UAE	18.5 %	[71]
Écorces d'orange	MAE	28 %	[72]
Déchets de tomate	MAE	25.42 %	[73]
Écorce de citron vert	MAE	15.91 %	[74]
Écorces de pamplemousse	UMAE	31.88 %	[75]
Déchets d'artichaut	EAE	22.1 %	[76]
Écorce de pomelo	UMAE	38 %	[77]
Écorce de fruit de la passion	UAE	40 %	[78]
Jacquier	MAE	29.59 %	[79]

1.3.2. Propriétés physico-chimiques de la pectine :

La composition chimique et la structure déterminent les propriétés et les performances de la pectine dans diverses applications. L'une des propriétés les plus importantes est sa capacité à gélifier [80]. Cette gélification résulte d'interactions complexes au sein des chaînes de pectine, impliquant des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des liaisons ioniques entre groupes hydroxyles et carboxyles, qu'ils soient méthylés ou amidés [81]. Ainsi, la solubilité de la pectine dans les milieux aqueux, influencée par la composition chimique, la structure, la force ionique, la valeur du pH et la température, joue un rôle important [82].

Parmi les facteurs mentionnés, le degré de méthylation, mesuré par le degré d'estérification, influence directement la capacité gélifiante de la pectine. La pectine à forte teneur en méthoxyle (HMP) forme des gels en milieux acides et sucrés, tandis que la pectine à faible (LMP) et moyenne teneur en méthoxyle (MMP) peut gélifier en présence d'ions métalliques polyvalents, sans sucre, selon le modèle de la « boîte à œufs » [83]. Le pH est un facteur crucial, déterminant la structure du réseau gélifié. À pH faible,

des gels rigides et irréversibles au cisaillement se forment, alors qu'à pH élevé, ils sont réversibles au cisaillement et plus faciles à étaler. La distribution des groupes méthoxyles et acylamino dans la structure de la pectine LM et MM impacte également la nature des gels formés [84]. La pectine HM, avec un degré d'estérification supérieur à 50 %, est un agent épaississant et stabilisant largement utilisé dans les formulations pharmaceutiques, jouant un rôle clé dans les systèmes de délivrance de médicaments à libération contrôlée [23].

La taille moléculaire constitue un facteur déterminant dans la solubilisation de la pectine et, par conséquent, dans ses propriétés de gélification. En comparaison avec la pectine à faible poids moléculaire, les molécules de pectine à poids moléculaire élevé présentent des chaînes plus longues, dotées d'un plus grand nombre de sites réactifs. En règle générale, les réseaux perméables formés entre les molécules de pectine et les ions métalliques polyvalents ont démontré une amélioration des propriétés rhéologiques, telles que la viscosité et le module élastique [85]. Pour obtenir un gel de pectine présentant une résistance mécanique, une résistance à la rupture et une viscosité élevées, il est nécessaire que le poids moléculaire (M_w) de la pectine dépasse 300 kDa. À l'inverse, la pectine à faible poids moléculaire (inférieure à 10 kDa) ne permet pas la formation de gel en raison du nombre restreint de sites réactifs disponibles [86].

La pectine, en tant que polymère d'origine biologique, est valorisée pour sa biodégradabilité, sa biocompatibilité, sa non-toxicité, son caractère renouvelable et son faible coût. Ces caractéristiques la rendent idéale pour un large éventail d'applications sans risque [87]. Toutefois, les propriétés antibactériennes limitées de la pectine, restreignent son utilisation dans des domaines nécessitant des capacités antimicrobiennes efficaces, tels que les emballages bioactifs, la délivrance contrôlée de substances médicamenteuses, l'ingénierie tissulaire et les dispositifs biomédicaux, notamment les pansements pour la cicatrisation des plaies [88, 89]. Pour surmonter ces limitations, la pectine a été combinée avec divers agents antimicrobiens, incluant des bactériocines [90], les lysozymes [91], la polylysine [92], la natamycine [93], ainsi que des extraits naturels tels que ceux d'Aloe vera et de curcumine [94]. Le chitosane, un polymère naturel reconnu pour ses propriétés antibactériennes, a également été combiné avec des polyphénols dérivés de plantes pour concevoir des films chitosane/pectine possédant des capacités antimicrobiennes [95-97]. De surcroît, des huiles essentielles d'origine végétale

ont été intégrées à la pectine pour renforcer ses propriétés antibactériennes [98]. Ces ajouts contribuent à compenser les limitations de la pectine dans le domaine biomédical.

Certaines études montrent que la pectine modifiée présente des propriétés antibactériennes contre diverses cultures microbiennes. Par exemple, Roza et al. [99] ont évalué l'activité antibactérienne de composites via la méthode de diffusion sur disque. Des cultures de pathogènes virulents, tels que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli*, ont été cultivées sur une couche d'agar viande-peptone de 4 mm d'épaisseur, et les composites ont été appliqués sur le milieu nutritif. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les zones d'inhibition de croissance microbienne ont été mesurées. Les résultats suggèrent que ces matériaux, grâce à leur action prolongée et à la non-agressivité de l'iode, pourraient être utilisés comme antiseptiques doux.

1.3.3. Modification de la pectine :

Grâce à la présence de divers groupes fonctionnels, tels que les hydroxyles, les carboxyles, les carbométhoxyles et les acylamino, la pectine est capable de générer une large gamme de dérivés. Ces dernières décennies ont été marquées par des modifications chimiques des propriétés de la pectine, notamment en ce qui concerne son hydratation, son gonflement et son érosion, afin de favoriser des applications en matière de libération de médicaments. Les modifications se classifient en trois catégories selon les mécanismes de réaction et les groupes fonctionnels impliqués : substitution (estérification, amidation, étherification, acétylation, etc.), propagation de chaîne (réticulation et/ou greffage) et dépolymérisation [100].

De nombreuses recherches ont été menées pour modifier la structure et les caractéristiques de la pectine via des procédés de dépolymérisation, de déméthoxylation et de substitution de groupes fonctionnels, tels que l'amidation, la sulfation et la thiolation [101-104]. Ces modifications permettent de varier les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la pectine, élargissant ainsi ses applications en tant que matériau biocompatible [105, 106]. Les principaux dérivés de la pectine, présentant des propriétés physico-chimiques distinctes, incluent la pectine amidée et la pectine à faible méthoxyle [107]. Leur synthèse repose généralement sur des procédés chimiques (voir Figure 1.4).

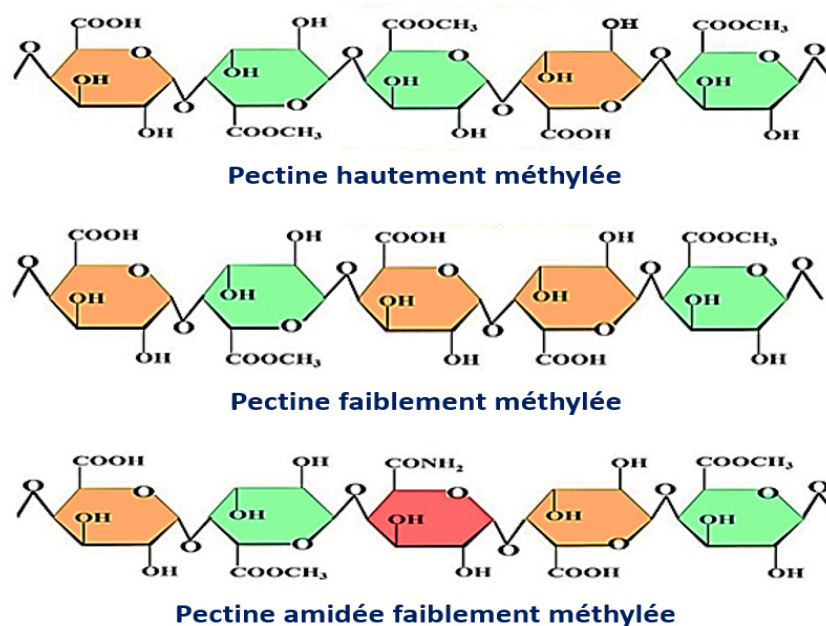


Figure 1.4 : Classification de la pectine [108].

Les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la pectine peuvent également être modifiées par des enzymes. Deux principales catégories d'enzymes interviennent sont impliquées : celles qui dégradent le l'homogalacturonane (HG) et celles qui dégradent le rhamnogalacturonane I (RG-I). Parmi les enzymes agissant sur le HG figurent la polygalacturonase, la pectine méthylestérase (PME), la pectate lyase et l'acétyl estérase de pectine. Pour le RG-I, on retrouve les hydrolases, lyases et acétyl estérases spécifiques. Ces enzymes, ayant des affinités pour différents sites sur les chaînes de pectine, génèrent des fragments de tailles variées (voir Figure 1.2).

Un exemple d'application de la PME consiste à convertir la pectine à haut degré de méthoxylation (HMP, 72 % DE) en pectine à faible méthoxylation (LMP, 35 % DE) [107], créant ainsi un système de libération ciblée pour le probiotique *L. casei* W8 au niveau du côlon. Cette modification réduit le potentiel zêta à -37 mV et le poids moléculaire de 177 à 143 kDa, augmentant significativement l'efficacité d'encapsulation et la stabilité.

En outre, diverses méthodes physiques, chimiques et enzymatiques peuvent être utilisées pour modifier la pectine, telles que la cavitation ultrasonique, l'homogénéisation à haute pression et le plasma à froid [109]. Ces techniques visent à améliorer l'émulsification, l'activité antioxydante et d'autres propriétés fonctionnelles, le plasma à pression atmosphérique étant une approche prometteuse encore peu explorée.

1.3.4. Stratégie de réticulation de la pectine avec les protéines :

La réticulation est une étape essentielle pour concevoir des hydrogels présentant les propriétés souhaitées, telles qu'une microstructure complexe et une stabilité accrue. Différentes méthodes, notamment la réticulation chimique, enzymatique [110], ainsi que la photo-réticulation [111], ont été employées avec succès. Parmi celles-ci, la réticulation chimique demeure la plus courante en raison de la variété des structures chimiques qu'elle permet d'obtenir [112]. Plusieurs agents réticulants ont prouvé leur efficacité, comme le glutaraldéhyde, la combinaison carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS), la génipine, l'éthylène glycol diglycidyle éther, l'acide citrique, et d'autres. Cependant, ces agents chimiques présentent certaines limitations, particulièrement dans le cadre des biomatériaux destinés à l'ingénierie tissulaire et à la médecine régénérative. Par exemple, le glutaraldéhyde et l'éthylène glycol diglycidyle éther sont partiellement cytotoxiques pour les cellules et les tissus [113, 114]. Bien que la génipine et l'EDC/NHS offrent une meilleure biocompatibilité, leur coût reste élevé pour de nombreuses applications [113, 114]. De plus, l'acide citrique nécessite un catalyseur et des températures élevées pour activer la réticulation, ce qui le rend inapproprié pour les hydrogels injectables.

Amirian et al. [115] ont mis au point un hydrogel réticulé *in situ*, considéré comme une option prometteuse pour les applications cliniques. Ce type d'hydrogel présente peu d'effets indésirables sur l'organisme et peut être facilement moulé pour s'adapter à des plaies aux formes irrégulières. Les deux méthodes principales pour synthétiser des hydrogels réticulés *in situ* sont les réactions d'addition de Michael et les réactions de base de Schiff. Cependant, les hydrogels injectables ne sont pas toujours adaptés aux applications cliniques en raison du temps de réaction relativement long de l'addition de Michael, qui peut dépasser 30 minutes. En revanche, les réactions de base de Schiff, basées sur la condensation réversible des amines et des aldéhydes, ne produisent que de l'eau comme sous-produit non toxique (voir Figure 1.5) [116, 117].

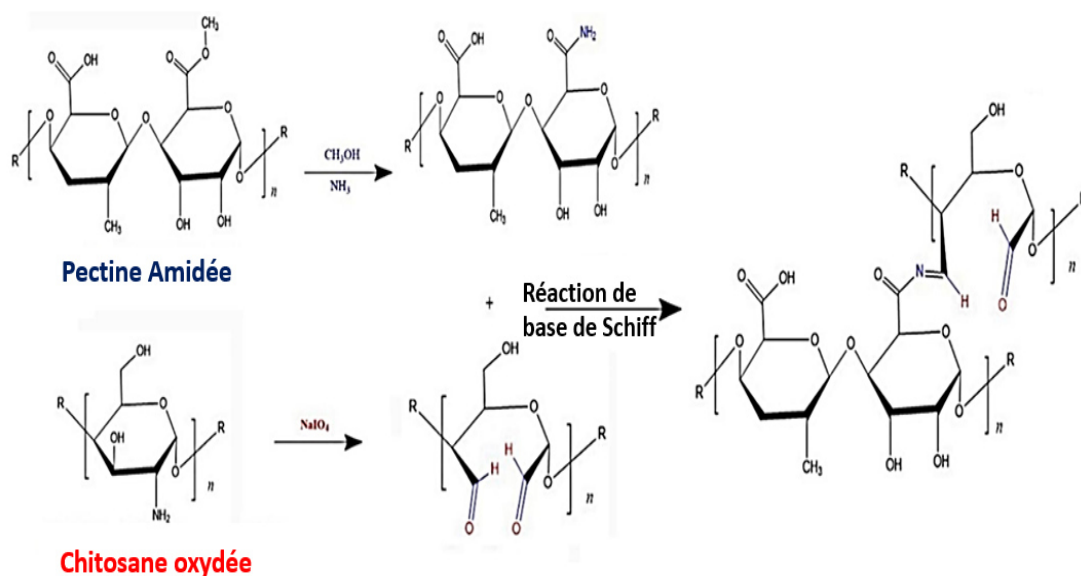


Figure 1.5 : Synthèse de la pectine amidée (AP) et du chitosane oxydée (OC), ainsi que la réticulation *in situ* par base de Schiff de l'hydrogel AP-OC [115].

Popovic et al. [118] ont développé une nouvelle pectine modifiée via une oxydation par périodate, suivie d'une amination réductrice avec la dopamine et le cyanoborohydrure de sodium. Cette approche a permis de créer des microbilles de pectine-dopamine avec de la laccase immobilisée, grâce à une polymérisation enzymatique en émulsion (voir Figure 1.6). Les laccases immobilisées, comparées à l'enzyme libre, ont montré une stabilité thermique améliorée et une meilleure résistance aux variations de pH.

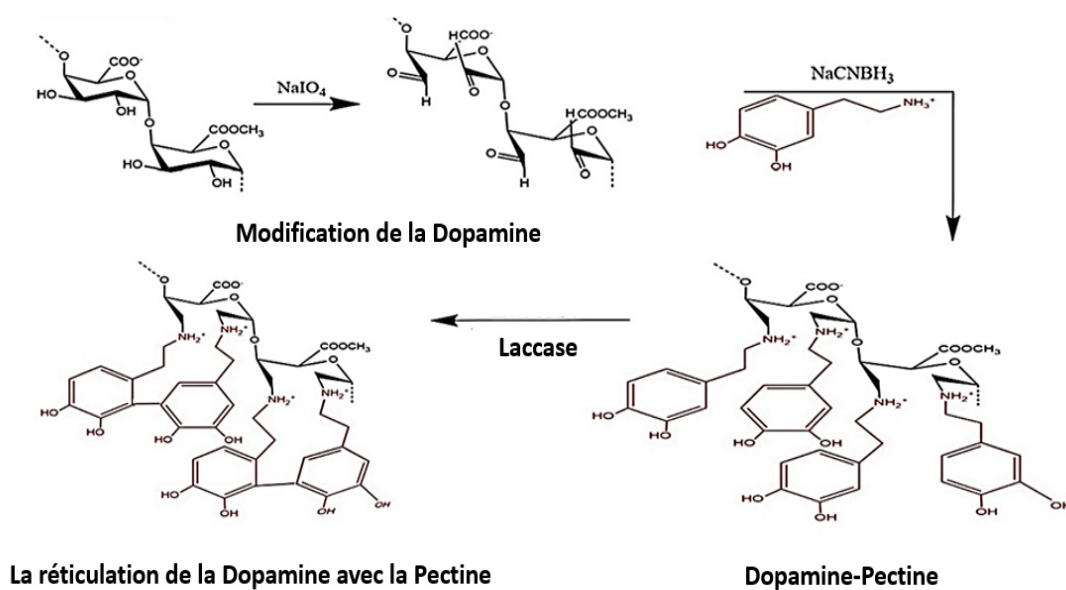


Figure 1.6 : Formulation de la pectine-dopamine par oxydation périodate, amination réductrice, dopamine, et cyanoborohydrure de sodium [118].

Par ailleurs, Muhoza et al. [119] ont montré que la réticulation de la gélatine et de la pectine avec de l'acide tannique modifie la structure secondaire des protéines, augmentant les points de fusion, le module de stockage, et renforçant les liaisons intermoléculaires. Cela a également réduit les structures en spirale aléatoire tout en augmentant l'hélice alpha. De plus, des microcapsules thermiquement stables ont été créées à partir de coacervats de gélatine et pectine réticulés, suggérant l'intérêt de l'acide tannique dans la fabrication de microcapsules alimentaires et pharmaceutiques.

1.4. Notions de base sur les hydrogels à base de pectine :

1.4.1. Définitions :

Les hydrogels sont des réseaux polymériques tridimensionnels (3D) capables de stocker une importante quantité d'eau au sein de leur structure, les rendant similaires aux microenvironnements des tissus vivants par leur porosité, leur souplesse, et leur configuration en 3D [120]. La porosité de ces hydrogels, notamment via leurs microcanaux, est cruciale pour la libération contrôlée de molécules bioactives comme des médicaments, peptides, ou protéines [121]. En fonction des interactions et du degré de réticulation des chaînes polymériques, les hydrogels peuvent être chimiquement stables ou instables [122]. Des interactions secondaires telles que les liaisons hydrogène, les forces ioniques et hydrophobes, ainsi que les interactions de van der Waals, stéréocomplexes et complexes polyélectrolytiques, jouent un rôle déterminant dans les hydrogels réticulés physiquement [123]. Ces derniers sont réversibles et se dissocient en réponse à divers stimuli (température, pH, concentration ionique). Les hydrogels réticulés chimiquement, quant à eux, sont permanents et ne se dissocient pas dans ces conditions [124].

Les hydrogels intelligents, capables de réagir à des stimuli externes (lumière, pression, champs magnétiques ou électriques) ou internes (pH, concentration ionique, enzymes, espèces réactives), sont d'un grand intérêt pour les applications biomédicales [125]. Ils subissent des modifications structurales réversibles ou irréversibles (gonflement, contraction, dégradation, transition sol-gel, auto-assemblage) en réponse à ces stimuli, influençant ainsi leurs propriétés physicochimiques et leur capacité à libérer des molécules [126],[127]. Les hydrogels injectables, adhésifs et conducteurs gagnent en importance avec les avancées dans les domaines biomédicaux. Contrairement aux méthodes chirurgicales classiques, les hydrogels injectables sont utilisés comme une

approche thérapeutique minimale invasive pour la libération de molécules actives ou la régénération tissulaire [128, 129].

Les recherches récentes se sont largement concentrées sur les hydrogels hybrides constitués de protéines et de polysaccharides. Ces deux types de biopolymères peuvent former des complexes via des interactions covalentes (réaction de Maillard, de Schiff, catalyse enzymatique, etc.) ou non covalentes (liaisons de van der Waals, interactions hydrogène, électrostatiques, hydrophobes) [130]. Ces interactions améliorent leurs propriétés structurelles et fonctionnelles. Bien que les hydrogels homopolymères présentent parfois une fragilité, les films d'hydrogel obtenus en combinant protéines et polysaccharides renforcent les interactions intermoléculaires, créant des structures supramoléculaires avec des fonctionnalités accrues [131].

1.4.2. Méthodes de fabrication des films d'hydrogel :

1.4.2.1. Méthode de moulage par coulée :

Le moulage par coulée constitue une méthode largement répandue pour la fabrication de films comestibles, en particulier ceux à base de protéines et de polysaccharides. Elle est également couramment utilisée dans la production de films à base d'hydrogel. La fabrication de ces films par moulage en solution repose sur la dissolution des polymères dans l'eau, suivie de phases de séchage et de réticulation, auxquelles peut s'ajouter l'extraction du polymère non réticulé (voir figure 1.7). Par ailleurs, afin d'améliorer la compatibilité des composants, cette technique peut être associée à des procédés complémentaires comme la congélation-décongélation [132]. Cependant, dans un processus simplifié de moulage en solution, il est impératif que le polymère se dissolve dans l'eau ou dans un solvant volatil [133].

Diverses améliorations ont été proposées afin d'optimiser les propriétés des films d'hydrogel. Zafar et al. [134] ont intégré des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) dans des films d'hydrogel à base de carboxyméthylcellulose (CMC) et de gélatine (GE) en utilisant le procédé de moulage en solution. Les films ont été élaborés en combinant des solutions à 2 % p/v de CMC et de GE, chauffées à 40 °C pendant 4 heures. Le mélange contenait 0,02 % d'azide de sodium et 1 mL de glutaraldéhyde comme agent de réticulation. Après deux heures de sonication, des nanoparticules de ZnO (1, 1,5, 2 et 2,5 % p/p) ont été ajoutées progressivement, obtenant une solution claire. Cette solution composite a été coulée dans des récipients en Téflon de 10 mL et laissée sécher à 25 °C

à l'air libre. Après environ 12 heures de séchage à 70 °C, les films ont été soigneusement retirés. Bien que cette méthode présente certaines limitations, telles que des formes fixes, la récupération des solvants et des temps de séchage longs, le moulage en solution reste adapté aux pratiques de laboratoire à petite échelle. Néanmoins, d'autres techniques se révèlent plus fiables pour la production à grande échelle [135].

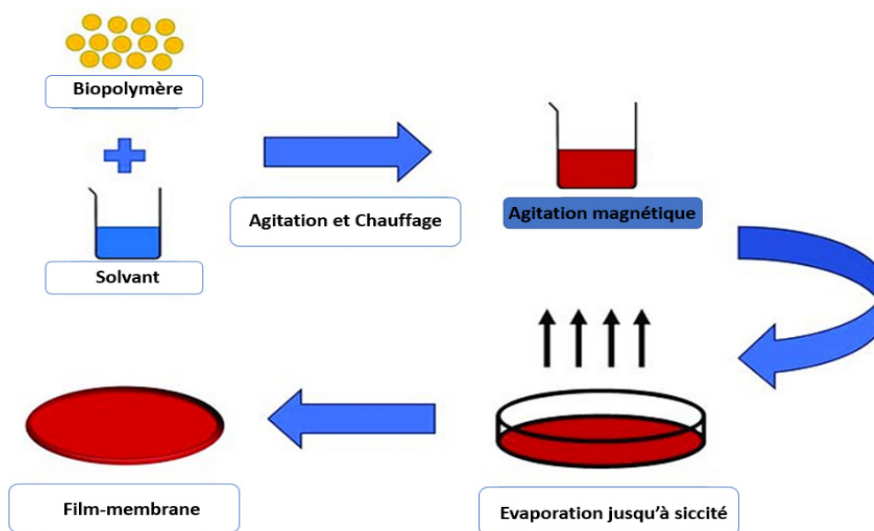


Figure 1.7 : Méthode de fabrication de films par coulée au solvant.

1.4.2.2. Méthode de polymérisation radicalaire libre :

La polymérisation radicalaire libre est une méthode classique pour produire des films en gel. Cette technique repose sur des radicaux libres pour initier la gélification. Un mélange de monomères, réticulants et initiateurs est polymérisé *in situ* entre deux substrats (voir Figure 1.8) [136]. Des hydrogels chimiquement réticulés se forment sous l'action des radicaux libres lorsque les monomères à faible poids moléculaire interagissent avec les réticulants [123]. Une autre technique en plein essor est la polymérisation initiée par UV, permettant la photolithographie ou la microstructuration des films à l'aide d'un masque photo, offrant un contrôle précis de la géométrie des films d'hydrogel [137]. Li et al. ont développé des films composites contenant de l'anthocyanine, basés sur un complexe polyelectrolytique de chitosane et de gélatine, améliorant ainsi la stabilité de l'anthocyanine grâce à une approche de greffage radicalaire libre [138].

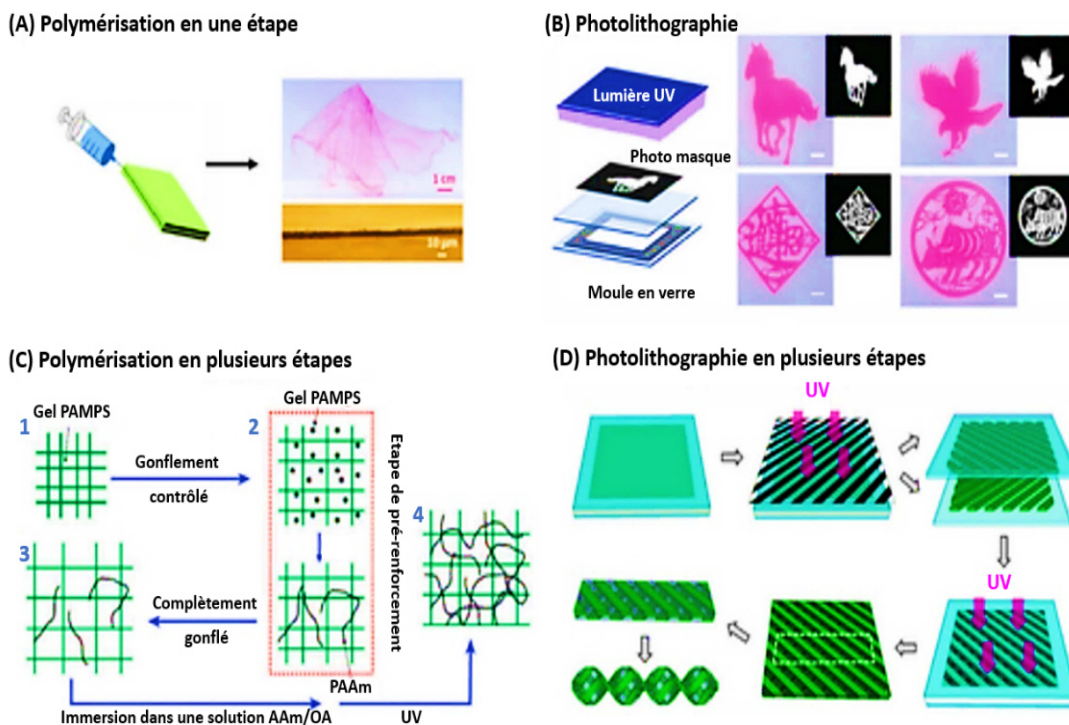


Figure 1.8 : Différents types de techniques de polymérisation [136].

1.4.2.3. Méthode d'impression en 3D :

L'impression 3D est une technologie émergente avec un potentiel considérable et de nombreuses applications dans divers secteurs, y compris l'industrie de l'emballage alimentaire. Elle présente des avantages marquants en comparaison avec les techniques de fabrication conventionnelles, notamment pour la production d'hydrogels aux structures variées [139]. Ce procédé repose sur la création d'un modèle 3D à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur, puis la conversion de ce modèle en un fichier STL. Ce fichier représente l'objet sous forme de maillage triangulaire, divisé en plusieurs couches bidimensionnelles interconnectées. L'objet est ensuite imprimé par une imprimante 3D qui dépose le matériau couche par couche sur un substrat. Parmi les technologies d'impression 3D les plus courantes, on distingue l'impression par jet d'encre, par extrusion et par lumière. Le procédé d'impression des hydrogels consiste souvent en une extrusion à froid de systèmes préétablis, avec peu ou pas de contrôle de la température. Une autre approche consiste à extruder les hydrogels à chaud à l'état sol, avant une transition rapide du sol au gel après dépôt. Cette technique permet d'imprimer plus facilement des gels très visqueux, car ceux-ci sont dans un état sol avant d'être transformés en films.

Leaw et al. [140] ont étudié l'effet de différentes concentrations de glycérine et d'extrait de baies d'aubépine (*Crataegus pinnatifida*, HBE) sur les propriétés mécaniques et antibactériennes de films hydrogels comestibles imprimés en 3D, à base d'amidon de maïs et de gélatine. Pour préparer les gels formant ces films, un mélange de biopolymères comprenant de l'amidon gélatinisé, de la gélatine, de la glycérine et du HBE a été préparé et conservé au réfrigérateur. Le logiciel Cura version 15.02.1 a été utilisé pour générer un modèle de film carré de 5×5 cm, enregistré au format STL via un site web de modèles 3D. Le gel a ensuite été converti en fichier g-code spécifique à une buse de 0,8 mm, optimisant les paramètres d'impression avec une épaisseur de paroi de 1,6 mm, une hauteur de couche de 0,75 mm et une densité de remplissage de 90 %. L'imprimante 3D Foodbot a été reliée au modèle 3D via une clé USB. Quinze minutes avant l'impression, 60 mL de gel ont été retirés du réfrigérateur, et les films, avec ou sans extrait, ont été imprimés à une température constante de 25,7 °C à une vitesse de 80 mm/s. Les films ont ensuite été laissés à sécher à température ambiante pendant 48 heures.

De même, l'efficacité des hydrogels à 2 % d'agar chargés de thiamine et des hydrogels à 3 % de kappa-carraghénane (κ C) pour l'impression 3D par extrusion à chaud a récemment été évaluée. Les résultats ont révélé que les cylindres imprimés en 3D libéraient plus d'hydrogel que ceux moulés par des méthodes traditionnelles, améliorant ainsi les caractéristiques physiques des structures et renforçant les possibilités de former des aliments via l'impression 3D [141]. Par ailleurs, des chercheurs [136] ont conçu un film hydrogel hybride avec un gradient d'épaisseur précisément contrôlé, capable de réagir de manière variée aux stimuli, ce qui permet des déformations programmées grâce à l'impression 3D par extrusion. Cette avancée a ouvert la voie à la production à grande échelle de matériaux à géométrie et caractéristiques programmables. Il est attendu que l'impression 3D améliore la fonctionnalité des hydrogels dans les applications d'emballage alimentaire, notamment pour le développement d'étiquettes électroniques et de capteurs intégrés dans l'hydrogel capables de surveiller des paramètres tels que l'humidité, la température, ou l'intégrité de l'emballage, fournissant des informations en temps réel aux consommateurs ou aux producteurs [142].

1.4.2.4. Méthode d'électrofilage :

L'électrofilage est en effet reconnu comme une technologie émergente pour la production de nanofibres, notamment dans les hydrogels, en raison de son coût modéré.

Cela lui confère un fort potentiel pour une utilisation industrielle [143]. Dans le secteur de la fabrication de films destinés à l’emballage alimentaire, ces nanofibres présentent plusieurs avantages : une meilleure résistance aux fissures par rapport aux films traditionnels, tout en maintenant une flexibilité et des propriétés mécaniques élevées. De plus, grâce à leur rapport surface/volume élevé, elles offrent de bonnes propriétés d’adhésion et permettent une absorption rapide de l’humidité ainsi qu’une libération progressive d’agents antibactériens dans les environnements d’emballage [144]. La fabrication de films en utilisant des hydrogels et des nanofibres a fait l’objet de nombreuses études, et une grande quantité de données de recherche sur ces deux matériaux est disponible [145-147]. La structure dense et uniforme obtenue par électrofilage confère aux hydrogels une homogénéité et une épaisseur réduite, favorisant ainsi leur utilisation pour des applications spécifiques comme les films antibactériens.

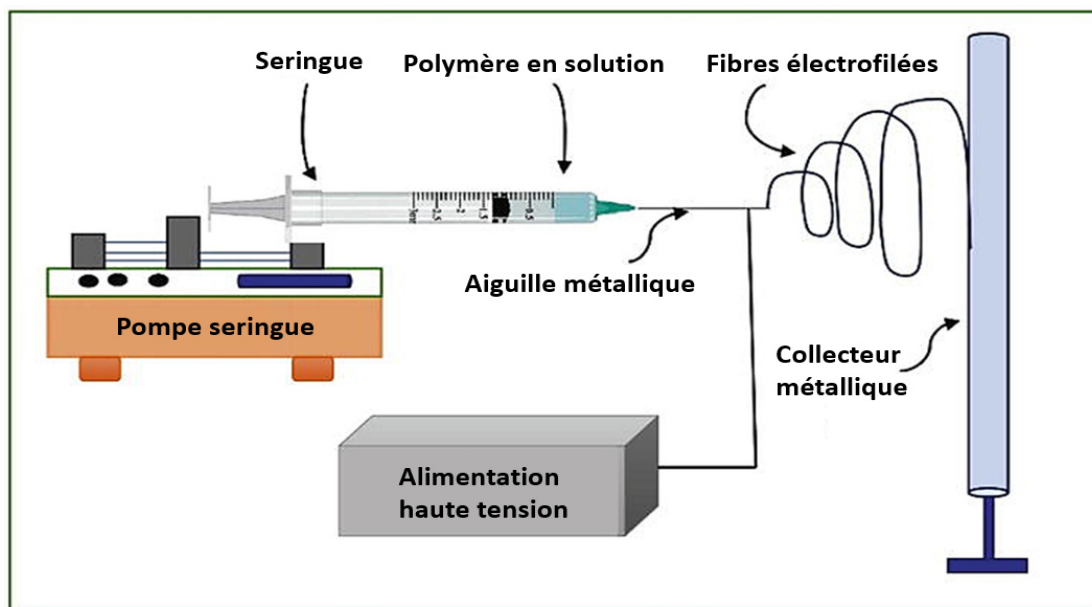


Figure 1.9 : Fonctionnalités de base du processus d'électrofilage.

1.4.3. Les hydrogels à base de pectine et leur renforcement :

La pectine (PE) est un polysaccharide complexe et hétérogène présent dans les membranes cellulaires des végétaux, en particulier dans les agrumes et les pommes. Elle est principalement constituée d'acide α -D-galacturonique (1–4), un sucre acide provenant de l'oxydation du D-galactose [148, 149]. Sa structure chimique renferme des groupes fonctionnels hydrophobes tels que les esters ($-\text{COO}^-$) et les amides ($-\text{NH}_2$), ainsi que des groupes pendants comme les hydroxyles ($-\text{OH}$) et carboxyles ($-\text{COOH}$), permettant une large gamme d'interactions chimiques (Figure 1.10) [150, 151].

La gélification ionique est une méthode couramment utilisée pour produire des hydrogels à base de pectine, reposant sur la réticulation des chaînes polymères par des interactions ioniques avec des cations multivalents tels que le calcium (Ca^{2+}) ou le zinc (Zn^{2+}). Ces ions forment des liaisons solides avec les groupes carboxylates de la pectine, améliorant ainsi ses propriétés de gélification. Des paramètres comme le pH, la température ou la concentration des réticulants permettent d'ajuster les propriétés du gel [150].

De nombreux matériaux comme les polysaccharides et la gélatine sont étudiés pour renforcer les hydrogels de pectine. Par exemple, Li et al. [152] ont démontré que l'oxydation de 50 % de la pectine produisait une structure rigide, propice à la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) [73], tandis qu'une oxydation à 20 % générerait un échafaudage plus souple, favorisant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) en cellules endothéliales (ECs).

Sarioglu et al. [153] ont étudié un hydrogel de pectine réticulé avec des ions calcium et zinc. Les échantillons contenant 6 % de pectine ont montré un profil prometteur de libération de médicaments [149]. De plus, Chen et al. ont combiné la pectine avec de la cellulose réticulée à l'aide d'un liquide ionique ($[\text{AMIm}]\text{Cl}$), créant un composite efficace pour l'hémostase, où un ratio pectine-cellulose de 5:2 a montré une efficacité accrue dans l'arrêt des saignements et une compatibilité immunitaire améliorée.

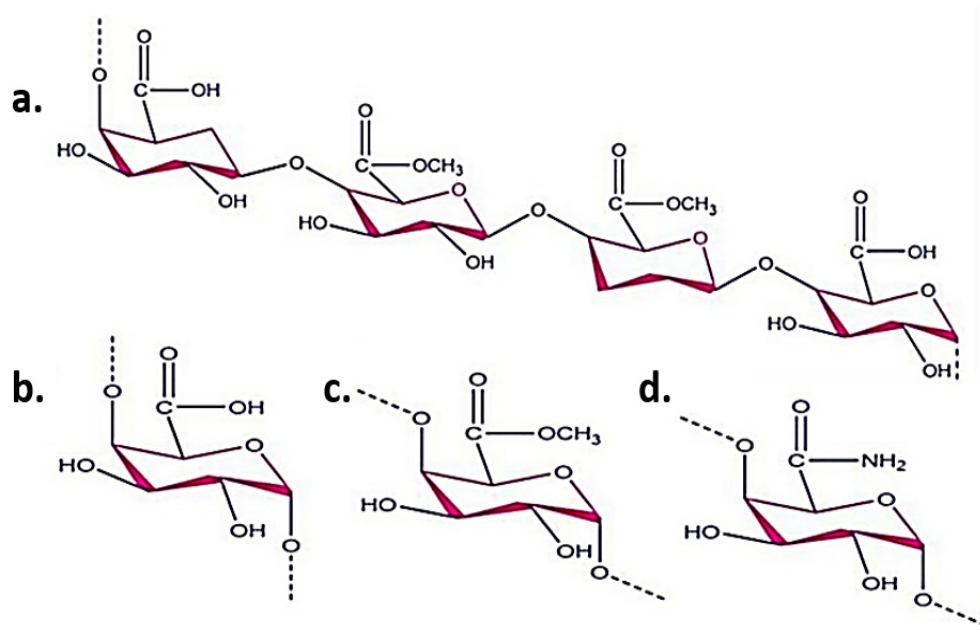


Figure 1.10 : (a) Squelette de pectine constitué de (b) groupes carboxyliques, (c) ester et (d) amide [154].

Morello et al. [155] ont exploré un composite pectine-chitosane, montrant que de faibles concentrations de polymère (1 % en poids) favorisaient la formation de sphéroïdes tumoraux avec une rigidité réduite. L'impact du chlorhydrate de lidocaïne (LDC) sur ces composites a également été étudié : à 10 % en poids, la lidocaïne a augmenté la porosité et réduit la taille des pores, positionnant ces composites en concurrence directe avec d'autres pansements commerciaux [156]. Enfin, le potentiel d'auto-guérison des hydrogels pectine-chitosane a été évalué par des réactions de Diels-Alder, permettant à l'hydrogel de supporter un poids de 500 g sans subir de dommages [157].

Catori et al. [158] ont utilisé des cristaux de cellulose nanométriques (CNC) pour renforcer les hydrogels de pectine. Deux méthodes, biomimétique et précipitation humide, ont été comparées, la première montrant une meilleure viabilité cellulaire. Phonrachom et al. [159] ont associé la pectine à du chitosane quaternisé (QCS) dans un hydrogel composite chargé de propolis, qui a démontré une inhibition bactérienne efficace. Chanmotri et al. [160] ont quant à eux mis au point des hydrogels injectables auto-réparants à base de pectine oxydée (OPEC) et de QCS, présentant des propriétés mécaniques et cicatrisantes optimisées. Amirian et al. [115] ont étudié l'effet de la pectine amidée (AP) sur les caractéristiques d'un hydrogel de chitosane oxydé (OC). Un hydrogel à faible teneur en AP (65 % en poids) a révélé une capacité de gonflement accrue et une meilleure biocompatibilité, grâce à la présence accrue de sites amine résiduels.

Plusieurs matériaux bioactifs ont été étudiés pour renforcer les hydrogels. Goel et al. [161] ont conçu un hydrogel pectine/collagène en incorporant des précurseurs de verre bioactif, montrant un soulagement rapide des douleurs dans les premières phases de guérison grâce à un taux élevé de libération de médicaments avec 25 % de précurseur. Clifford et al. [162] ont exploré l'acide polygalacturonique (PGA), un polysaccharide de pectine, pour favoriser la déposition de particules bioactives telles que TiO_2 , l'hydroxyapatite et Bioglass 45S5®. Le PGA a permis de maintenir un environnement cytocompatible, favorisant la croissance des ostéoblastes. De plus, l'introduction du peptide arginine-glycine-acide aspartique (RGD) dans les hydrogels de pectine, avec 150 mM de CaCl_2 comme agent de réticulation, a optimisé la croissance des myoblastes [163].

Le diméthylacrylamide (DMMA), dérivé de l'acrylamide, a été synthétisé avec la pectine via irradiation gamma. L'hydrogel pectine-DMMA, avec un ratio de 1:2 et une dose de 5 kGy, a présenté le meilleur rendement en gel [164]. Par ailleurs, l'intégration

de polylactide aminolysé (PLLA) dans un hydrogel de pectine oxydée et de fibroïne de soie a permis une libération prolongée de vancomycine hydrochloride (vanco HCl), améliorant l'efficacité thérapeutique [165].

Concernant le renforcement des hydrogels à base de pectine avec de la gélatine, Chetouni et al. [148] ont utilisé de la pectine oxydée et du glutaraldéhyde (GTA), obtenant une fermeture des plaies de 99,3 % avec un hydrogel G/OP dans un ratio de 60:40. Nejati et al. [166] ont combiné 15 % de gélatine greffée polypyrrole (GP) avec de la pectine oxydée, obtenant des propriétés mécaniques et physiques idéales pour des échafaudages osseux. Fares et al. [167] ont développé des réseaux polymères interpénétrants (IPN) avec de la pectine-greffée polycaprolactone (pectine-g-PCL) et de la gélatine méthacryloyl (GelMA), favorisant un développement cellulaire optimal à des concentrations spécifiques. Wang et al. [168] ont démontré que l'ajout de 10 mM d'ions calcium dans les hydrogels PECMA/GelMA augmentait la compression et l'absorption sanguine.

Pour le traitement des plaies, l'hydrogel PVA/pectine avec un ratio de 9:1 a montré une résistance à la compression optimale [169]. En ce qui concerne les plaies diabétiques, le polysaccharide de pectine RG-I (OPS) a montré un fort potentiel de cicatrisation en favorisant la formation des vaisseaux sanguins et l'épithélialisation [170]. Enfin, An et al. [171] ont étudié la libération prolongée de deux médicaments, combretastatine A4 (CA4) et doxorubicine hydrochloride (DOX.HCl), démontrant leur efficacité dans la destruction des cellules tumorales.

Le renforcement des hydrogels à base de pectine est résumé ci-dessous (Tableau 1.2).

Tableau 1.2. Revue bibliographique sur les renforcements des hydrogels à base de pectine.

Renforcement de l'hydrogel à base de pectine	Objectif de l'étude	Préparation	Caractérisation	Résultat	Réf
Pectine-Cellulose	Différents rapports de poids de pectine et de cellulose pour l'hémostase	Réticulation chimique	MEB, IR-TF, DRX, ATG, test MTT, cytométrie en flux	Le rapport de poids pectine-cellulose de 5:2 inhibe efficacement la perte de sang avec une excellente compatibilité immunologique, empêchant la formation de macrophages	[153]

Renforcement de l'hydrogel à base de pectine	Objectif de l'étude	Préparation	Caractérisation	Résultat	Réf
Pectine – CNC	Effet de deux méthodes différentes dans la minéralisation de l'hydroxyapatite	Réticulation chimique	IR-TF, MET, H-RMN, DRX, DLS, MEB, ATG, analyseur de texture	La synthèse de l'hydroxyapatite par méthode biomimétique est préférable à la précipitation humide, car la viabilité cellulaire des hydrogels est légèrement plus élevée, favorisant plus de sites pour la croissance cellulaire	[158]
Pectine oxydée (OPEC) – QCS	Différentes combinaisons de QCS et OPEC pour un hydrogel auto-réparateur	Durcissement thermique	H-NMR, IR-TF, XPS, rhéomètre, analyseur de texture, test de guérison des plaies	Les combinaisons de QCS (0,6 mL) et OPEC (0,4 mL) démontrent le potentiel hydrogel prometteur en termes de fermeture des plaies, d'adhésivité, de cytocompatibilité et de caractéristiques mécaniques	[160]
Polysaccharide pectique RG-I (OPS)	Préparer un hydrogel à base de polysaccharides pour la guérison des plaies diabétiques	Déprotéinisation enzymatique	IR-TF, rhéomètre, électrophorèse laser Doppler, test FRAP, test MTT	L'incorporation de 400 µg/mL d'OPS a accéléré la guérison des plaies en stimulant l'épithélialisation, la prolifération, la migration cellulaire ainsi que la formation de vaisseaux sanguins	[170]
Pectine – RGD	Influence de la molarité de CaCl ₂ sur la prolifération cellulaire	Système de filage humide	Microscopie à fluorescence, microscopie confocale, MEB	L'utilisation de 150 mM de CaCl ₂ est préférable pour obtenir une forte cohésion des fibres avec l'introduction de peptides RGD, créant un environnement favorable à la prolifération des myoblastes	[163]
PGA – Particules bioactives (TiO ₂ , hydroxyapatite et verre bioactif)	Développer une méthode de traitement électrochimique pour modifier rapidement la surface des matériaux d'implants métalliques	Déposition électrophorétique anodique (EPD)	MEB, DRX, IR-TF, mesure de l'angle de contact	L'utilisation d'hydrogels PGA permet de maintenir une culture cellulaire de type ostéoblaste et favorise leur prolifération, tout comme dans un implant non revêtu	[162]

Renforcement de l'hydrogel à base de pectine	Objectif de l'étude	Préparation	Caractérisation	Résultat	Réf
Pectine oxydée – GP	Effet du pourcentage de poids de GP pour un hydrogel conducteur injectable et des échafaudages de microparticules	Réaction de base de Schiff	MEB, test DPPH, UV-vis, iodométrie, IR-TF, test MTT, test de ninhydrine, test de compression	Les propriétés mécaniques et physiques du GP à 15 % - pectine oxydée, y compris sa porosité et sa conductivité, satisfont aux critères d'un échafaudage osseux approprié	[166]
Pectine/collagène – précurseurs de verre bioactif (TEOS, TEP, acétate de sodium, acétate de calcium)	Impact de la composition des précurseurs de verre bioactif sur le composite hybride collagène-pectine	Séchage par lyophilisation	IR-TF, ATG, MEB, EDAX, MET, test MTT, test LDH	Le composite hydrogel à une concentration de 25 % de précurseur a montré une meilleure viabilité cellulaire et offre un soulagement rapide pendant les premières étapes de guérison grâce à la forte concentration de libération de médicaments	[161]
Pectine-g-PCL–GelMA	Effet de la concentration de GelMA, pectine-g-PCL et Ca^{2+} dans les hydrogels IPN et semi-IPN	Photoréticulation	H-RMN, IR-TF, DSC, ATG, MEB, test de traction et de compression	La concentration de 1,15 % de pectine-g-PCL et 25 % de GelMA a démontré les modules élastiques les plus élevés, cependant, une concentration de Ca^{2+} supérieure à 2 % peut former un IPN plus faible	[167]
Biochar/pectine/alginate (BPA)	Effet des différentes compositions de BPA sur les variables influençant le processus d'élimination du Cu(II) par adsorption	Coordination métallique Cu(II), séchage par lyophilisation	DRX, XPS, IR-TF, MEB-EDS, ATG	La capacité d'adsorption maximale expérimentale la plus élevée a été obtenue avec un rapport de masse de 10:1 pectine/alginate, avec 0,25 % de biochar à un pH optimal de 6	[172]
Pectine-Gomme arabique	Fabrication potentielle d'un hydrogel pectine/gomme arabique chargé en NAR pour améliorer l'absorption cutanée et favoriser la cicatrisation des plaies	Réticulation chimique, séchage par lyophilisation	IR-TF, MEB, DSC, EDS%	97 % des plaies dans l'hydrogel AG/pectine chargé en NAR ont été fermées au jour 18, indiquant une phase complète de ré-épithélialisation	[173]

Renforcement de l'hydrogel à base de pectine	Objectif de l'étude	Préparation	Caractérisation	Résultat	Réf
Pectine amidée (AP) –chitosane oxydé (OC)	Impact de la teneur en AP sur les caractéristiques de l'hydrogel	Réaction de base de Schiff, séchage par lyophilisation	MEB, IR-TF, H-RMN, C-RMN, UV-vis, ATG, DSC, test MTT	65 % d'AP dans l'hydrogel composite a montré de meilleures performances de gonflement et une meilleure biocompatibilité grâce à la présence de plus de sites amines résiduels	[115]
Pectine/chitosane – β GP	Effet de la concentration globale du polymère sur la densité des sphéroïdes tumoraux	Réticulation physique	Rhéomètre, test de compression, FTIC, test live/dead, microscopie optique	La densité des sphéroïdes et la rigidité étaient inversement proportionnelles, où les échantillons à faible concentration présentaient un grand nombre de sphéroïdes	[155]
Pectine (Pec) / Chitosane quaternisé (QCS) – Propolis	Fabrication et caractérisation des films d'hydrogel QCS/Pec chargés en propolis pour les pansements	Méthode de coulée de solvant	IR-TF, test de traction, analyseur de texture, UV-vis	Les films d'hydrogel QCS/Pec traités à la propolis ont amélioré la stabilité des films dans le milieu tout en empêchant la croissance bactérienne	[159]
Pectine/alginat – Simvastatine	Étude de l'efficacité de l'utilisation de SIM dans un pansement à base d'alginat pour les plaies diabétiques de type I	Réticulation chimique	Microscope optique, ELISA, hématologie, test HP	Le traitement avec un hydrogel chargé en SIM accélère le processus de guérison des plaies en favorisant la synthèse du collagène et en réduisant le temps d'épithélialisation	[174]
Pectine oxydée	Effet des degrés d'oxydation sur les échafaudages en nanofibres d'hydrogel	Oxydation au periodate, électrofilage, réticulation par ADH	MEB, IR-TF, AFM, RT-PCR, CLSM	Un niveau d'oxydation de 50 % produit un échafaudage plus rigide, permettant la différenciation des MSC en VSMC, tandis qu'un niveau de 20 % favorise la différenciation en ECs	[152]
PECMA/GelMA – Ions de calcium	Effet de la teneur en calcium sur les propriétés hémostatiques de l'hydrogel PECMA/GelMA	Séchage par lyophilisation, photoréticulation	IR-TF, H-NMR, MEB, test MTT	Les hydrogels PECMA/GelMA avec 10 mM d'ions calcium fournissent un module de compression optimal et une absorption supérieure pour absorber rapidement le sang	[168]

Renforcement de l'hydrogel à base de pectine	Objectif de l'étude	Préparation	Caractérisation	Résultat	Réf
Pectine oxydée (OP) – Gélatine	Effet des différents ratios de gélatine et de pectine (ou pectine oxydée) en tant que matériau d'échafaudage potentiel	Réticulation chimique	SEC, IR-TF, test TNBS, kit BCA, MALS, VD, DRI	Un taux de fermeture des plaies notable (99,3 %) sans cicatrice a été démontré avec l'hydrogel G/OP (60/40) à des concentrations de pectine oxydée inférieures à 0,75 mg/mL	[148]
Pectine – PVA	Effet des différents ratios de mélange PVA/pectine sur les propriétés	Gel-dégel	MEB, IR-TF, rhéomètre, test de compression, test MTT	La meilleure résistance à la compression a été trouvée dans l'hydrogel PVA/pectine de 9:1	[169]
Pectine – Chitosane	Effet de la lidocaïne hydrochloride (LDC) sur les propriétés de l'hydrogel CS-PEC	Séchage par lyophilisation, impression 3D	MEB, analyseur de texture, IR-TF, ATR, DSC, HPLC, UV-vis	Une concentration de 10 % de LDC a montré une porosité accrue et une réduction de la taille des pores, avec une force adhésive similaire à celle des pansements du marché	[156]
Pectine – Théophylline	Impact de la concentration en solution de pectine et en ions calcium sur l'efficacité de la libération du médicament	Réticulation ionique (Ca^{2+} ou Zn^{2+})	IR-TF, MEB, ATM, goniomètre, test WST-1	La meilleure libération du médicament a été observée avec un échantillon à base de calcium fabriqué avec une solution de pectine à 6 %	[149]
Pectine- Chitosane	Impact de la réaction D-A sur la création d'un hydrogel hybride auto-réparateur pour la délivrance de médicaments	Réaction de Diels-Alder	MEB, IR-TF, TG-DSC, UV-vis, test MTT	L'hydrogel obtenu par réaction D-A a pu supporter un poids de 500 g sans se briser	[157]
Pectine oxydée/fibroïne de soie – PLLA	Effet du PLLA électrofilé sur la libération soutenue de vancomycine hydrochloride (vanco HCl)	Mécanisme de Schiff	MEB, IR-TF, UV-vis, DMTA, test de compression, test MTT	La vanco HCl libérée de l'hydrogel SF/OP a été plus durable après l'introduction des fibres PLLA-chargées en médicament	[165]

Renforcement de l'hydrogel à base de pectine	Objectif de l'étude	Préparation	Caractérisation	Résultat	Réf
Pectine modifiée par aldéhyde (pectine-CHO) – P(NIPAM-stat-AH)	Impact de la modification des ratios de pectine-CHO à P(NIPAM-stat-AH) sur la libération soutenue de combretastatine A4 disodique et de doxorubicine hydrochloride (DOX·HCl)	Réticulation par acylhydrazone	UV-vis, rhéomètre, test CCK-8, IR-TF	Les hydrogels chargés avec un ratio 1:1 de pectine-CHO à pH 5,4 ont démontré une meilleure destruction des cellules tumorales grâce à une accumulation accrue des médicaments	[171]
Pectine – DMAA	Effet des différentes compositions de fractions de gel et des doses de radiation sur l'hydrogel obtenu Pectine-DMAA	Radiation gamma	IR-TF, MEB, DSC	Le meilleur rendement en gel et l'équilibre de gonflement ont été obtenus avec une dose de radiation optimale de 5 kGy et un ratio de 1:2 d'hydrogel Pectine-DMAA	[164]

1.4.4. Applications pharmaceutiques des hydrogels de pectine :

Les hydrogels de pectine jouent un rôle déterminant dans les formulations pharmaceutiques en raison de leurs caractéristiques particulières qui permettent de moduler précisément la cinétique de libération substances médicamenteuses. Cela les rend particulièrement adaptés à de nombreuses applications dans le domaine pharmaceutique et biomédical (Figure 1.11). Ces hydrogels optimisent l'efficacité thérapeutique en assurant une libération progressive et prolongée des médicaments ou des composés bioactifs.

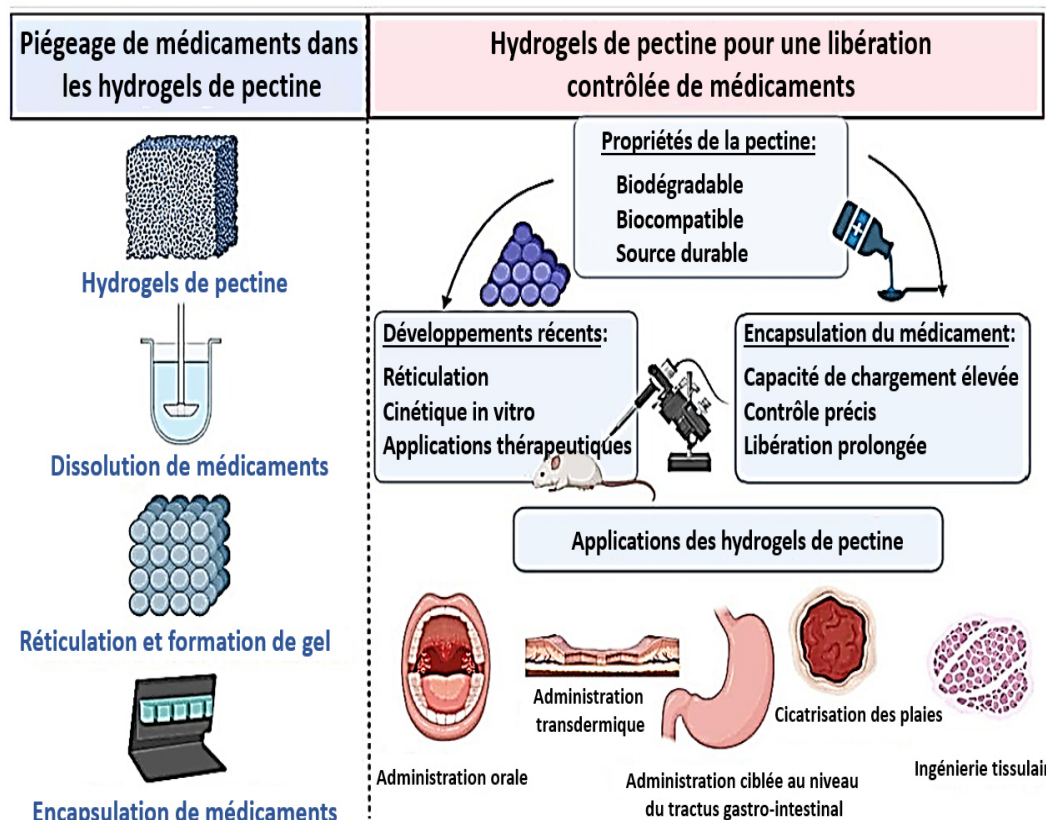


Figure 1.11 : Exemples d'applications des hydrogels de pectine dans les formulations pharmaceutiques.

1.4.4.1. Utilisation des hydrogels de pectine dans la libération contrôlée des médicaments :

De nombreuses applications potentielles des gels de pectine ont récemment été rapportées. Par exemple, Kocaaga et al. [175] ont recouru à des simulations de dynamique moléculaire afin de déterminer la concentration optimale de médicament à incorporer dans des hydrogels de pectine LMP. Cette approche garantit la préservation de l'intégrité structurelle de l'hydrogel tout en assurant un contrôle précis de la libération du médicament, améliorant ainsi l'efficacité thérapeutique. Les hydrogels de pectine contenant 30 mg de procaine par gramme ont montré un faible taux de dégradation de 0,001 g/min. Une étude *in vitro* a révélé que ces hydrogels libéraient de manière contrôlée la totalité des 30 mg de procaine d'un hydrogel de 670 mg en 24 heures.

Hafeez et al. [176] ont conçu un système innovant de gel à base de pectine, sensible aux stimuli, permettant un contrôle précis de la libération de la ceftriaxone, offrant ainsi une solution prometteuse pour la délivrance ciblée de médicaments. Cet hydrogel, élaboré

à partir d'un mélange de polysaccharides naturels tels que le chitosane et la pectine, d'un polymère synthétique (polyalcool vinylique) et d'un agent de couplage respectueux de l'environnement (3-aminopropyl(diéthoxy)methylsilane), a révélé une plateforme polyvalente avec des usages dans l'ingénierie tissulaire et la délivrance régulée de médicaments. Les polymères mentionnés ont été combinés et soumis à une réticulation avec diverses concentrations d'agents réticulants, utilisant une méthode de coulée en solution. L'étude sur la libération contrôlée des médicaments, réalisée dans une solution de PBS, a révélé que plus de 90 % de la ceftriaxone a été libérée en 180 minutes, indiquant un profil de libération soutenu et efficace.

Zafar et al. [177] ont cherché à concevoir un système de délivrance contrôlée du chlorhydrate de tapentadol en élaborant des réseaux interpénétrés (IPN) à partir d'un copolymère de natrosol-pectine, d'acide acrylique et de bisacrylamide de méthylène. Ces IPN ont été formulés via la technique de polymérisation radicalaire libre. Le pourcentage de gonflement a augmenté de 85,14 % à 92,53 % avec l'augmentation des quantités de polymères natrosol et pectine. À l'inverse, une concentration plus élevée en bisacrylamide de méthylène a entraîné une diminution du gonflement, passant de 84 % à 66,89 %. Les analyses ont démontré que la délivrance du médicament à partir de l'IPN formulé était significativement plus élevée sous des conditions alcalines à pH 7,4, contrastant avec une libération plus faible observée à un pH acide de 1,2.

Par ailleurs, Islam et al. [178] ont conçu un hydrogel superabsorbant en modifiant la cellulose avec de la pectine et de la mucine pour une libération contrôlée de la curcumine. Les résultats ont démontré que la libération de la curcumine était influencée par des paramètres tels que le taux de gonflement, les propriétés mécaniques et le comportement d'érosion de la matrice. Les hydrogels pectine-mucine ont montré une libération plus lente et prolongée de la curcumine dans un environnement sanguin simulé, suggérant des interactions hydrophobes entre la curcumine et les biopolymères, améliorant ainsi sa rétention.

Le tableau 1.3 illustre les diverses applications des hydrogels de pectine impliquant la libération contrôlée ou prolongée des médicaments.

Tableau 1.3. Applications des hydrogels de pectine dans la libération de médicaments.

Polymère utilisé/type de pectine	Médicament encapsulé	Études <i>in vitro/in vivo</i>	Résultats	Réf
Acylhydrazone /pectine oxydée	5-Fluorouracile	Le taux de libération a dépassé 76 % à pH 6,8 et plus de 80 % à pH 7,4. Après 24 heures d'exposition, les gels 3, 4 et 5 ont tous montré une inhibition des lignées cellulaires MCF-7, avec des ratios de prolifération cellulaire inférieurs à 80 %	L'hydrogel à base de pectine a démontré une excellente cytocompatibilité avec les lignées cellulaires L929. Un effet inhibiteur significatif a été observé contre les lignées cellulaires MCF-7.	[179]
Carboxyméthyl cellulose/hydrazide de pectine	Silibinine	La silibinine a montré un profil de libération prolongée, avec moins de 5 % libéré après 24 heures dans un PBS à pH 7,4, et moins de 10 % lorsque le pH est passé à 5,4 durant le même intervalle. Selon le test CCK-8, l'hydrogel silibinine-pectine, à des concentrations de 100 mg/L et 200 mg/L, a réduit la viabilité des cellules LA795 à environ 73,98 % $\pm$ 10,25 % et 29,26 % $\pm$ 5,56 %, respectivement. Le poids de la tumeur dans le groupe hydrogel + 100 mg/kg de silibinine a significativement diminué par rapport au groupe recevant seulement 100 mg/kg de silibinine.	Les résultats ont montré que l'hydrogel chargé de silibinine a considérablement amélioré l'efficacité antitumorale <i>in vivo</i> tout en réduisant de manière marquée la toxicité associée à la silibinine.	[180]
Poly(3-méthoxydiphénylamine)/pectine pure	Ibuprofène	Lorsque les hydrogels de pectine pure sont réticulés avec du fer sous un potentiel électrique de 1 V, l'exposant de mise à l'échelle (n) diminue de 1,36 à 0,45 à mesure que le ratio molaire de réticulation au fer augmente. Cette transition suggère un passage de l'érosion matricielle à un mécanisme de diffusion purement fickienne. Dans les hydrogels de pectine pure réticulés avec de l'acide citrique sous un potentiel électrique de 1 V, les exposants de mise à l'échelle (n) varient de 0,62 à 0,71. Ces valeurs augmentent avec des ratios molaires de réticulation à l'acide citrique plus élevés, suggérant que le mécanisme de transport implique une diffusion anormale et un gonflement de la matrice.	La libération de l'ibuprofène à partir des hydrogels de pectine était caractérisée par quatre modes distincts : diffusion fickienne, transport anormal, transport de type II, et transport de type super II.	[181]

Pectine d'aubépine (HPC)/protéine de <i>Tenebrio molitor</i> (TMPT)	Curcumine	Seuls 16,29 % de la curcumine ont été perdus dans le fluide gastrique simulé, lorsqu'elle est encapsulée dans le HPC-TMPT. La libération de curcumine à partir de l'hydrogel HPC-TMPT a suivi le modèle de Hixson-Crowell, indiquant une libération prolongée basée sur un mécanisme de corrosion.	Les études de digestion <i>in vitro</i> ont confirmé que l'hydrogel HPC-TMPT a significativement amélioré la stabilité de stockage et la biodisponibilité de la curcumine.	[182]
Pectine réticulée au Fe^{3+}	Acide hyaluronique (HYA)	Le traitement avec HYA7PC3 et HYA5PC5 a entraîné une réduction de 99,9 % de <i>S. aureus</i> après 120 minutes, avec une éradication microbienne complète atteinte après 360 minutes. HYA7PC3 a entraîné la mort complète des cellules de <i>P. aeruginosa</i> après 360 minutes, tandis que HYA5PC5 a atteint ce résultat en 180 minutes.	L'hydrogel HYA/pectine réticulé au Fe^{3+} , optimisé pour la cicatrisation des plaies, démontre des propriétés d'auto-guérison exceptionnelles. L'hydrogel a montré des effets antibactériens contre <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i> en libérant du Fe^{3+} lors de sa dégradation. Il a montré une non-toxicité envers les cellules fibroblastiques humaines.	[183]
Coing (Q)/pectine	Dompéridone	Le pourcentage de charge en médicament variait entre 68 % et 86 %. Ces éponges d'hydrogel ont montré un comportement de gonflement sensible au pH, avec un gonflement maximal observé dans un tampon phosphate à pH 7,4. Les formulations ont montré une libération allant de 62,55 % à 85,12 % à pH 6,8 et de 67,23 % à 92,52 % à pH 7,4 dans la solution tampon phosphate. L'augmentation de la concentration de réticulant a conduit à une réduction de la libération de dompéridone, diminuant de 77,50 % à 66,501 % dans les formulations QPC1 à QPC3.	Les éponges d'hydrogel ont montré un comportement sensible aux stimuli, permettant une libération contrôlée de la dompéridone sur 10 heures à pH 7,4, tandis qu'une libération minimale du médicament s'est produite dans des conditions de pH acide.	[184]

En plus d'assurer une libération contrôlée, ces hydrogels optimisent les effets thérapeutiques dans les domaines pharmaceutiques et dermatologiques, en offrant des solutions efficaces pour l'administration transdermique et topique des principes actifs [185].

Paradee et al. [185] ont proposé une approche novatrice pour la libération transdermique de l'ibuprofène via des composites d'hydrogel de pectine et de cellulose bactérienne (BC) combinés à du polypyrrole. Ce polymère conducteur permet une

libération contrôlée lors de l'application d'un champ électrique. La libération maximale d'ibuprofène a atteint 80 % dans les composites contenant 30 % de BC (m/m), sous un stimulus électrique de 7 V.

Martinez et al. [186] ont exploré l'utilisation de patchs cryogel de pectine-PVA pour un traitement antimicrobien. Ces patchs, contenant de l'enrofloxacin et de la kératinase, ont montré une libération de 17 % de l'enrofloxacin en cinq heures dans des conditions mimant le pH de la peau humaine. L'ajout de kératinase a réduit cette libération à 6,9 %, suggérant un impact significatif de l'enzyme sur la libération contrôlée de médicaments dans un environnement cutané simulé.

Par ailleurs, les hydrogels de pectine ont suscité un intérêt croissant dans les systèmes de libération de médicaments destinés au tractus gastro-intestinal et au côlon, en raison de leur sensibilité au pH. Ces hydrogels protègent les médicaments dans l'estomac et libèrent leur contenu dans le côlon, améliorant ainsi l'efficacité des thérapies tout en minimisant les effets indésirables. Cette innovation promet des avancées significatives en matière de thérapie ciblée [187].

Aslam et al. [184] ont conçu des éponges hydrogel superporeuses à base de coing et de pectine pour une libération prolongée et sensible au pH de la dompéridone, un médicament gastro-intestinal. Leur capacité de gonflement dépendait du pH, avec un maximum observé à pH 7,4 et un minimum à pH 1,2. Les éponges ont libéré la dompéridone pendant 10 heures à pH 7,4. Les études histopathologiques ont montré que les organes critiques tels que les reins, les intestins, le foie, les poumons et le cœur présentaient une fonction cellulaire normale, sans aucun signe d'inflammation dans la structure cellulaire.

Wu et al. [188] ont développé des billes hydrogel alginate/pectine réticulées avec du Ca^{2+} pour encapsuler des émulsions Pickering chargées de resvératrol. Ces billes ont montré une libération contrôlée dépendante du pH, augmentant la libération du resvératrol dans le fluide intestinal simulé, améliorant ainsi sa biodisponibilité.

Un hydrogel pectine/polyacrylamide, sensible au pH et activé enzymatiquement, a été développé pour la libération ciblée du budésônide dans le côlon, répondant ainsi aux besoins spécifiques du traitement de la colite ulcéreuse. L'analyse par microscopie électronique à balayage a révélé des structures poreuses au sein de l'hydrogel, favorisant

une encapsulation optimale du médicament. Ce système a démontré une efficacité d'encapsulation de 81,2 %, ainsi que des coefficients de corrélation élevés pour divers modèles cinétiques, indiquant une libération prolongée et contrôlée du principe actif [189].

Mala et al. [190] ont étudié l'encapsulation de la broméline dans des billes hydrogel à base de pectine et d'amidon résistant aux acides. L'ajout de l'amidon dans la formulation a permis d'améliorer l'efficacité d'encapsulation (81,25 %) et la libération contrôlée, tout en conférant une stabilité accrue en milieu gastrique par rapport aux hydrogels composés uniquement de pectine. La broméline a montré une libération plus rapide dans le fluide intestinal simulé (pH 7,4) que dans le fluide gastrique (pH 1,2).

1.4.4.2. Utilisation des hydrogels de pectine pour la cicatrisation des plaies :

Les hydrogels de pectine ont attiré une attention croissante pour la cicatrisation des plaies, grâce à leur origine naturelle, leur biocompatibilité et leur capacité à maintenir un environnement humide favorable à la guérison. Leur rôle prometteur dans la réparation tissulaire a conduit à de nombreuses recherches visant à optimiser leur efficacité dans le traitement des plaies [191].

Chen et al. [192] ont mis au point un hydrogel biodégradable auto-cicatrisant, intégrant des propriétés bioadhésives et antioxydantes. Cet hydrogel a été conçu à partir de pectine hydrazide et de carboxyméthylcellulose oxydée (OCMC), et a été utilisé pour encapsuler un facteur de croissance épidermique modifié (mEGF), spécifiquement destiné à la cicatrisation des plaies diabétiques. L'hydrogel formé rapidement a prouvé son efficacité pour recouvrir des plaies irrégulières, tout en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), contribuant ainsi à une meilleure cicatrisation. De plus, il a favorisé une libération prolongée de l'albumine bovine (BSA), atteignant 37,5 % dans des conditions acides.

Dans un modèle *in vivo* de plaies diabétiques, l'hydrogel chargé en mEGF a montré des résultats significatifs en accélérant la fermeture des plaies. Au jour 16, les plaies traitées avec l'hydrogel-mEGF étaient presque complètement guéries, contrairement au groupe témoin qui présentait encore des plaies ouvertes [192]. Ces résultats confirment l'efficacité de l'hydrogel de pectine pour promouvoir une régénération tissulaire rapide et prolongée, tout en maintenant un environnement humide propice à la cicatrisation.

En outre, Alsakhawy et al. [173] ont utilisé un hydrogel à base de gomme arabique (GA) et de pectine pour encapsuler la naringénine (NAR). Cet hydrogel chargé en NAR a montré une efficacité d'encapsulation exceptionnelle d'environ 99,79 % et une charge médicamenteuse remarquable de 15,96 %. L'évaluation visuelle des plaies, illustrée dans la Figure 1.12, a révélé l'absence de rougeurs ou d'inflammations dans les groupes traités avec l'hydrogel GA-pectine et l'hydrogel encapsulé avec NAR. À l'inverse, le groupe traité avec de la gaze stérile a présenté des signes d'inflammation, comme des rougeurs et des œdèmes.

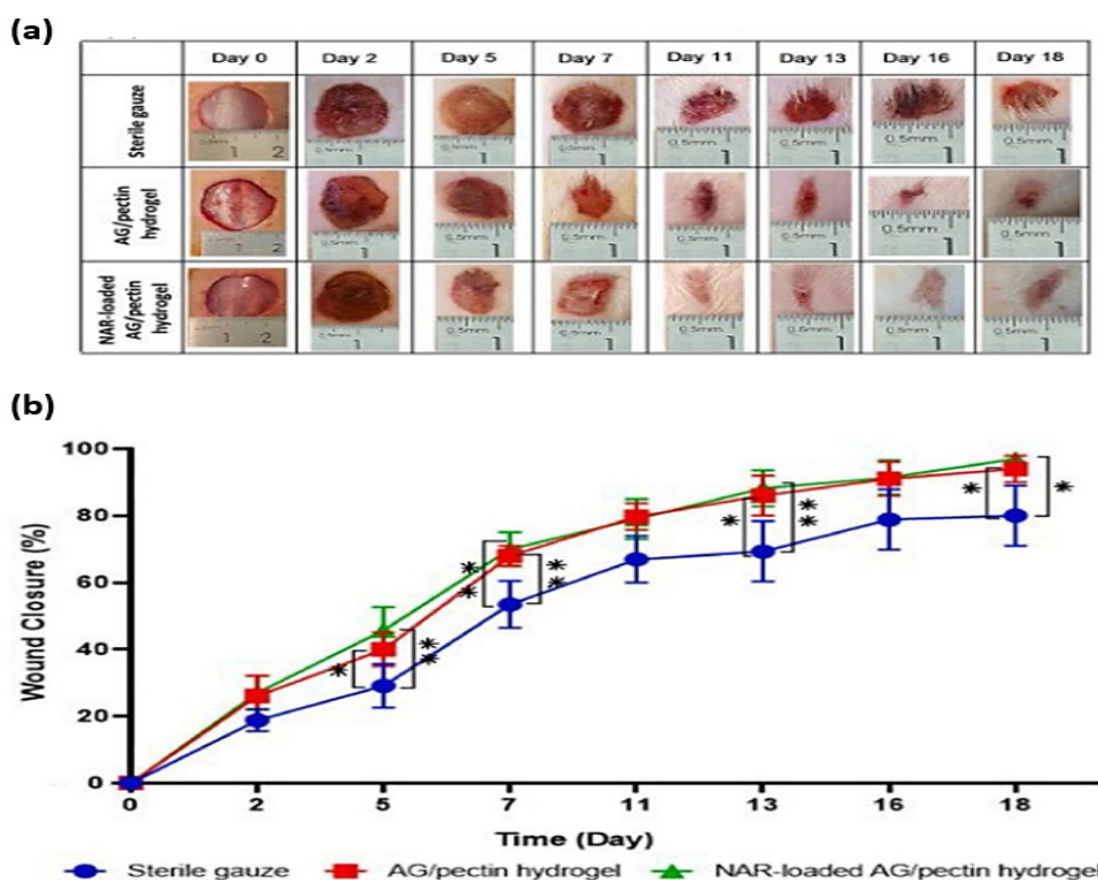


Figure 1.12 : (a) Photographies démontrant le développement de la cicatrisation des lésions chez des espèces animales présentant des excisions cutanées, répartis en différents groupes de traitement, ainsi que (b) le pourcentage de fermeture des plaies [173].

Au jour 11, les plaies traitées avec l'hydrogel GA-pectine encapsulé avec NAR ont montré un progrès significatif de cicatrisation, l'hydrogel absorbant efficacement les exsudats et créant ainsi un environnement sain. Comme illustré dans la Figure 10b, les groupes traités avec l'hydrogel GA-pectine et l'hydrogel encapsulé avec NAR ont montré une amélioration notable et statistiquement significative du pourcentage de fermeture des plaies en comparaison avec le groupe témoin qui a reçu un traitement à l'aide de gaze

stérile. De plus, l'hydrogel GA-pectine encapsulé avec NAR a démontré une réépithélialisation rapide et complète en 18 jours, avec un taux de fermeture des plaies impressionnant de 98 %. Ce résultat est attribué à la libération contrôlée de la NAR, en plus de ses propriétés antioxydantes et antiapoptotiques. L'hydrogel chargé en NAR a facilité une cicatrisation accélérée en stimulant l'angiogenèse et le dépôt de collagène, tout en réduisant l'expression de marqueurs inflammatoires tels que le TNF- α et des facteurs d'apoptose comme BAX [173].

Zhao et al. [193] ont conçu des hydrogels en utilisant deux types distincts de polysaccharides naturels : la pectine oxydée (OPC) et le chitosane carboxyéthylé (CEC), ainsi qu'un hydrogel composite à base de polyéthylèneimine (PEI)-CEC-OPC. Le CEC a servi de matrice, tandis que le PEI et l'OPC ont été employés comme agents réticulants. Lorsque des solutions de CEC et d'OPC ont été combinées à des fractions massiques de 4 % et 9 % p/p, l'hydrogel ainsi obtenu a démontré une efficacité antibactérienne remarquable, dépassant 97 %, contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. L'ajout de 0,75 % p/p de PEI dans la formulation a permis d'augmenter l'efficacité antibactérienne à plus de 98 %, montrant un potentiel prometteur dans la prise en charge des infections bactériennes associées aux plaies.

De plus, une combinaison de chitosane quaternisé (QCS) et de pectine a été utilisée pour améliorer la solubilité dans l'eau et les propriétés antibactériennes des films d'hydrogel [159]. L'ajout de propolis dans ces films a renforcé leurs capacités de cicatrisation. Cette association de QCS et de pectine a aussi permis d'améliorer la résistance à la traction des films d'hydrogel, renforçant leur stabilité et permettant de contrôler la libération de la propolis. Les films chargés en propolis ont montré une activité antioxydante comprise entre 22 % et 37 %. Le taux de libération de la propolis a varié : environ 22 % pour les films à base de QCS, 78 % pour ceux à base de pectine, et 64 % pour ceux à base de QCS-pectine. Les films d'hydrogel chargés en propolis-QCS ont montré une fermeture des plaies de -3,25 %, tandis que l'ajout de pectine a considérablement amélioré cette fermeture, atteignant environ 53,13 %. Ces films ont également démontré des effets antibactériens significatifs, notamment contre *S. aureus* et *S. pyogenes*, tout en restant non toxiques pour les cellules fibroblastiques de souris NCTC clone 929 [159].

1.4.4.3. Utilisation des hydrogels à base de pectine pour la thérapie anticancéreuse :

Les hydrogels à base de pectine ont suscité un intérêt croissant en oncologie en raison de leur biocompatibilité et de leur capacité à encapsuler des agents anticancéreux. Ces hydrogels permettent une libération ciblée des médicaments, améliorant ainsi l'efficacité du traitement tout en réduisant les effets indésirables systémiques. Leur potentiel dans le traitement localisé du cancer est prometteur pour optimiser les résultats des patients [194, 195].

Un exemple notable est celui de Yin et al. [180], qui ont développé un hydrogel biodégradable en incorporant la silibinine dans un mélange de pectine et de carboxyméthylcellulose oxydée (OCMC). La silibinine, un agent possédant des propriétés anticancéreuses pulmonaires, cible spécifiquement le canal ionique TMEM16A. Les auteurs ont étudié l'effet de l'encapsulation de la silibinine dans un hydrogel pectine-OCMC pour une application thérapeutique dans un modèle murin de cancer du poumon. Dans l'essai CCK-8, un hydrogel contenant de la silibinine (100 mg/L et 200 mg/L) a réduit la viabilité des cellules LA795 à 73,25 % et 31,25 %, respectivement. Des évaluations anticancéreuses *in vivo* ont ensuite été réalisées. L'efficacité d'inhibition de la prolifération tumorale a été renforcée dans le groupe hydrogel-silibinine (200 mg/kg), illustrée par une réduction de la taille tumorale.

Au cours de cette étude, les souris des groupes hydrogel, silibinine (100 mg/kg) et hydrogel-silibinine (100 mg/kg et 200 mg/kg) ont montré une augmentation constante de leur poids corporel. Toutefois, dans le groupe silibinine (200 mg/kg), le poids corporel a diminué à 78 % de celui du groupe témoin, avec une mortalité successive avant la 4e dose. Après la 6e mesure, les souris ont été euthanasiées et les tumeurs extraites pour analyse. Le groupe traité par hydrogel-silibinine a montré des tumeurs significativement réduites par rapport aux groupes témoins et au groupe silibinine seul.

Les souris traitées avec l'hydrogel combiné à la silibinine (100 mg/kg) ont présenté une réduction notable du poids tumoral, comparé au groupe silibinine seul, tandis que le groupe hydrogel-silibinine (200 mg/kg) a montré une réduction encore plus importante. Cet hydrogel s'est formé rapidement et a permis une libération contrôlée du médicament sensible au pH, grâce à ses liaisons d'acylhydrazone, le rendant ainsi adapté à une utilisation injectable [180].

De plus, An et al. [171] ont été parmi les premiers à développer des hydrogels injectables et biodégradables à base de pectine, ouvrant ainsi la voie à des thérapies anticancéreuses avancées. Un hydrogel a été synthétisé en utilisant de l'aldéhyde de pectine biodégradable (pectine-CHO) et un mélange polymère de poly(N-isopropylacrylamide-stat-acylhydrazide). Ces hydrogels injectables sont capables d'encapsuler et de délivrer efficacement des médicaments anticancéreux, tels que le chlorhydrate de doxorubicine (DOX) et le combretastatine A4 phosphate disodique (CA4), directement aux sites tumoraux.

L'incorporation de DOX dans les hydrogels a significativement entravé la croissance des cellules CT-26. Les auteurs ont observé que les traitements avec l'hydrogel encapsulé de DOX et de CA4 ont conduit à une réduction des volumes tumoraux par rapport aux traitements avec des médicaments libres. L'administration intraveineuse du médicament libre chez les souris a entraîné une intensité de fluorescence cytopathique plus faible au site tumoral, comparée aux groupes injectés par voie intratumorale, comme illustré dans la Figure 1.14. Les analyses menées *in vitro* et *in vivo* ont validé à la fois la biodégradabilité et la biocompatibilité de l'hydrogel, ainsi que sa capacité à réduire la toxicité des médicaments tout en montrant des propriétés de libération contrôlée [171].

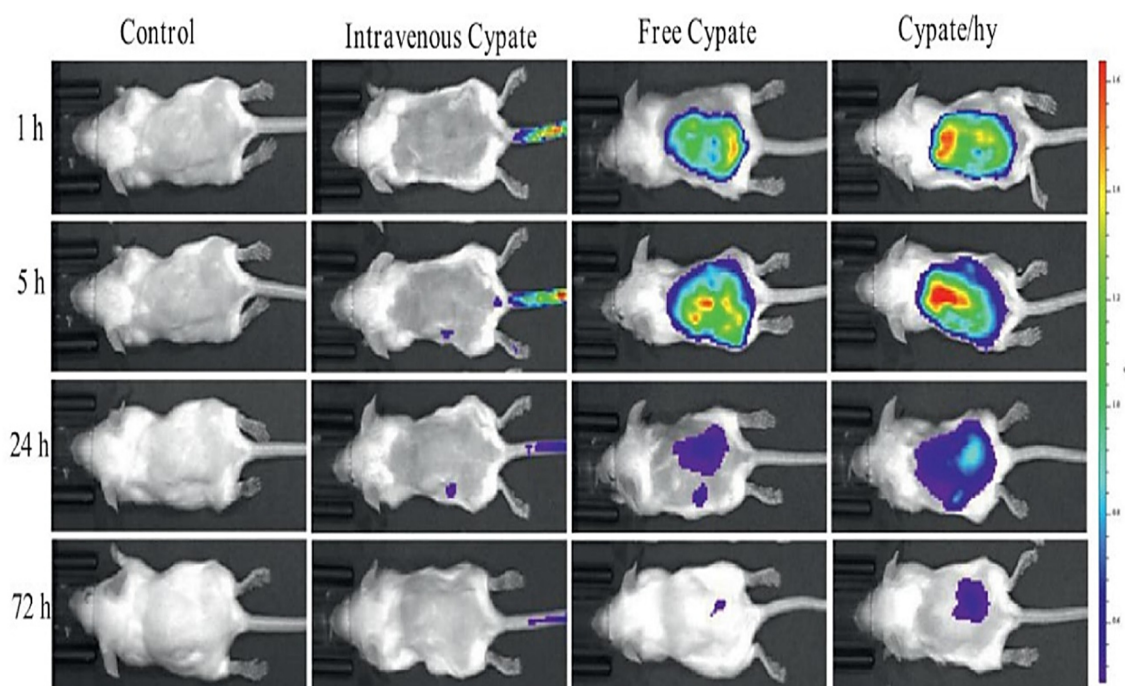


Figure 1.13 : Suivi de la rétention et de l'accumulation du médicament dans un hydrogel par imagerie NIRF après des injections intraveineuses et intratumorales de cypate ou de cypate/hydrogel à différents moments [171].

1.4.4.4. Utilisation des hydrogels de pectine pour l'ingénierie tissulaire :

La diversité et la polyvalence des hydrogels les distinguent non seulement dans le domaine de la délivrance ciblée de médicaments, mais également dans des applications variées telles que l'ingénierie tissulaire [196]. L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire centré sur la régénération des tissus par l'intégration de cellules avec un échafaudage, conçu pour imiter les conditions physiologiques et favoriser la création de nouveaux tissus [197]. Les cellules, les échafaudages et les facteurs de croissance sont collectivement désignés sous le terme de « triade », car ils constituent les éléments essentiels de l'ingénierie tissulaire [198]. Les échafaudages jouent un rôle crucial en tant que support temporaire, facilitant l'adhésion, la prolifération et la croissance cellulaires, ainsi que la régénération de nouveaux tissus pour restaurer la fonctionnalité ; les hydrogels de pectine constituent un groupe de matériaux d'échafaudage particulièrement significatif [199].

Les réseaux hydrogels de pectine ont la capacité de retenir un volume considérable d'eau au sein de leur structure. Cette caractéristique les rend largement utilisés comme échafaudages dans l'ingénierie tissulaire [199]. De plus, les hydrogels peuvent être élaborés par divers mécanismes de réticulation, présentant des propriétés physico-chimiques ajustables et un niveau élevé de biomimétisme qui imite la matrice extracellulaire (MEC) des tissus natifs [200]. La plupart des MEC sont organisées en réseaux poreux similaires aux hydrogels, intégrant des protéines fibreuses dans une matrice douce composée de glycosaminoglycanes (GAGs) et de protéoglycanes [197].

Les hydrogels ont gagné en importance dans les applications d'ingénierie tissulaire, notamment pour la réparation des tissus dermiques, du cartilage, des vaisseaux sanguins, des os, de la cornée et d'autres tissus mous [197, 201]. Parallèlement, ils sont également reconnus comme des échafaudages imitant efficacement la MEC, offrant une approche prometteuse pour le remplacement des tissus endommagés [202]. La MEC est cruciale pour le cartilage, jouant une fonction essentielle dans la régulation de l'homéostasie physiologique de l'environnement microcellulaire. Contrairement aux autres tissus, le cartilage ne possède pas de lymphatiques, de vaisseaux sanguins ni de nerfs [198]. Les échafaudages destinés au cartilage doivent présenter une excellente biocompatibilité, une porosité appropriée, une résistance mécanique adéquate, et des structures semblables à celles du collagène de type II dans la matrice cartilagineuse. Parmi ces critères, les

échafaudages hydrogels, physiquement élastiques, avec une surface lisse et un contenu élevé en eau, montrent un potentiel significatif pour imiter l'environnement microcellulaire normal du cartilage, les rendant ainsi idéaux pour la régénération cartilagineuse [203].

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Introduction :

Ce chapitre est consacré à une présentation exhaustive du matériel, ainsi qu'aux méthodologies de synthèse et de caractérisation mises en œuvre tout au long de notre étude, en détaillant les étapes clés de la préparation et de l'évaluation des matériaux développés. Il met en lumière la stratégie expérimentale adoptée dans cette étude, de la sélection des matières premières à l'évaluation des propriétés finales des films, afin de garantir la pertinence et la fiabilité des résultats obtenus.

L'organisation de cette section suit une approche structurée, articulée autour de deux grandes parties, chacune visant à décrire les étapes fondamentales de notre travail de recherche.

- La première section est consacrée à la présentation des matières premières utilisées dans l'élaboration des films d'hydrogels nanocomposites à base de pectine amidée et de gélatine, réticulées par l'acide tannique oxydé et enrichis de nanoparticules d'argent réduites *in-situ*, conférant ainsi aux films des propriétés antimicrobiennes et biologiquement actives.
- La deuxième section s'intéresse aux protocoles expérimentaux utilisés pour la préparation des films d'hydrogels nanocomposites, ainsi qu'aux méthodes de caractérisation physico-chimiques et biologiques appliquées pour évaluer leurs performances. À cet égard, les films obtenus sont soumis à une série de tests rigoureux, tant *in vitro* qu'*in vivo*, afin d'analyser en détail leurs propriétés de rétention d'humidité, de résistance mécanique, ainsi que leur comportement biologique, notamment en termes de prolifération cellulaire et de lutte contre les infections. Les techniques de caractérisation employées incluent la spectroscopie, la microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET), ainsi que des essais de cytotoxicité et de cicatrisation. Ces analyses visent à fournir une évaluation exhaustive des propriétés des films d'hydrogels nanocomposites, en tenant compte de leur impact biologique et de leur potentiel d'application dans le domaine biomédical.

2.2. Produits utilisés :

La pectine d'agrumes USP, présentant un degré de méthylation de 65 % et une teneur en acide galacturonique de 74 %, a été fournie par Spectrum Chemical (Espagne). La gélatine, sous forme de poudre de qualité pharmaceutique, d'origine bovine (Type B, 80-100 Bloom), avec une masse moléculaire de 41 000 g/mol, une densité de 1358 kg/m³, et un pH de 4,5 à 5,5 à 25°C, fournie par PanReac AppliChem (Espagne). L'acide tannique, également en poudre et de qualité alimentaire, a été obtenu de VWR International (France).

Les autres produits chimiques utilisés, de grade analytique, incluent l'acide tannique (TA) (sous forme de poudre, qualité alimentaire, VWR International, France), le glycérol et l'azoture de sodium (NaN₃) (Biochem Chemopharma Co, Canada), le nitrate d'argent (AgNO₃) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) (Merck, Allemagne), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzène/TNBS à 5 % (m/v) dans l'eau (Sigma-Aldrich, Allemagne), le laurylsulfate de sodium LSS (Sigma-Aldrich, Allemagne), le fluide corporel simulé FCS (Biochemazone, Canada), la solution étalon d'argent (Sigma-Aldrich, Allemagne), le tampon phosphate saline/PBS (Scharlau, Espagne) et le chlorure de calcium (CaCl₂) (Sigma-Aldrich, Allemagne).

Hydrocoll®, un pansement commercial, constitué de carboxyméthylcellulose sodique, de polyisobutène, d'un copolymère à blocs styrolène-isoprène-styrolène, et d'un film de polyuréthane, permettant les échanges gazeux, mais restant imperméable aux liquides et aux germes, et recouvert de colle acrylate de qualité médicale. Ce pansement hydrocolloïde auto-adhésif a été fourni par Hartmann (France).

Du sang humain non coagulé contenant de l'acide citrate dextrose (ACD) a été obtenu de la banque de sang de l'hôpital CHU Beni-Messous à Alger. Par ailleurs, de l'eau ultrapure a été produite à l'aide d'un système ELGA PURELAB Option-Q.

2.3. Méthodes suivies :

Dans la présente étude, une variété de méthodes et de protocoles expérimentaux a été adoptée afin de répondre aux objectifs préalablement définis. Chaque méthode a été appliquée selon une démarche méthodologique stricte, garantissant la rigueur scientifique nécessaire à la validité et à la reproductibilité des résultats. Les étapes suivantes, présentées selon un ordre chronologique, décrivent les différentes phases de l'expérimentation, offrant ainsi une vue d'ensemble claire et structurée de l'évolution de la recherche:

2.3.1. Synthèse de la pectine amidée :

Le protocole expérimental rapporté par Reitsma et al [204] a été utilisé pour la synthèse de pectine amidée (AP). Une quantité de 10g de pectine commerciale a été dissoute, sous agitation modérée, dans un mélange pré-refroidi composé de 40 mL de solution d'ammoniaque (33 %) et de 60 mL d'isopropanol. La réaction a eu lieu dans un ballon fermé, plongé dans un bain-marie maintenu à 5°C pendant 2 heures. Le solide en poudre a été récupéré par filtration à l'aide de papier filtre Whatman® Grade 42. Une fois la filtration réalisée, le solide collecté a été dispersé dans de l'isopropanol dans un milieu acide (pH compris entre 1,5 et 2,0) et agité pendant 10 minutes, suivi d'une nouvelle étape de filtration. Pour éliminer le chlore résiduel, le solide obtenu a été soumis à plusieurs lavages avec de l'isopropanol à 70 %. Enfin, la pectine amidée (AP) résultante a été rincée à l'isopropanol pur, et la substance purifiée a été laissée à sécher à l'air pour obtenir des poudres d'AP.

2.3.2. Oxydation de l'acide tannique :

La synthèse de l'acide tannique oxydé (OTA) a été réalisée en suivant le protocole expérimental décrit par Osetrov et al. [205]. Le protocole consiste à dissoudre 0,26 g d'acide tannique (TA) dans 0,6 moles de solution de peroxyde d'hydrogène (3 % H_2O_2). Le pH de la solution a été ajusté à 10 à l'aide d'une solution de NaOH (2M). Le mélange a ensuite été maintenu sous agitation modérée et continue à 70°C pendant 30 minutes. Après cette étape, la suspension a été neutralisée à pH 7 en ajoutant soigneusement de l'HCl (6M). L'OTA ainsi formé a été récupéré par filtration sous vide et soigneusement rincée à l'eau ultrapure. L'acide tannique oxydé (OTA) obtenu a ensuite été séché à 40 °C dans un four à circulation d'air et conservé dans des dessiccateurs pour préserver sa stabilité avant toute utilisation future.

2.3.3. Elaboration des films d'hydrogel AP:GE@OTA et AP:GE@OTA/Ag :

Les films d'hydrogels ont été préparés en dispersant un mélange de 5 g de gélatine et de pectine commerciale dans 100 mL d'eau ultrapure maintenue à 60°C, selon un rapport pondéral de 3:2. Ce ratio a été sélectionné en fonction des résultats obtenus dans des études antérieures [148, 206]. Afin d'éviter toute contamination microbienne, du sodium azide a été ajouté à une concentration de 0,02 % (p/v) en tant qu'agent antimicrobien. Une agitation continue a été maintenue jusqu'à dissolution complète des biopolymères. Une fois cette étape est réalisée, différentes quantités d'OTA (0 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %) ont été ajoutées à la solution.

1 %, 2 % et 5 % du poids total des AP et GE) ont été ajoutées au mélange polymère sous agitation constante à 60°C pendant 30 minutes, dans le but de favoriser la réticulation du réseau polymère. Par la suite, du glycérol a été ajouté comme plastifiant à une concentration massique de 40 % du poids total des biopolymères secs, et le mélange a été agité de manière continue pendant 16 heures à 60°C pour obtenir une solution homogène. Les dispersions plastifiées ont ensuite été dégazées, puis versées dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, chaque boîte contenant environ 20 g de mélange. Les films ainsi formés ont été laissés à sécher à température ambiante dans un environnement aéré pendant 3 jours.

Une fois le séchage terminé, les films ont été soigneusement retirés de leurs supports, puis immergés dans une solution de nitrate d'argent (20 mg/L, pH 7,6) pendant 30 minutes [207]. Ils ont ensuite été soumis à plusieurs lavages à l'eau ultrapure pour éliminer les résidus, avant d'être séchés à l'air. Enfin, les films ont été placés dans des dessiccateurs, maintenus à une humidité relative (HR) de 53 % à une température de 25°C, pendant 7 jours, avant d'être soumis aux tests. La figure suivante regroupe les différentes étapes de la préparation des films AP:GE, AP:GE@OTA et AP:GE@OTA/Ag.

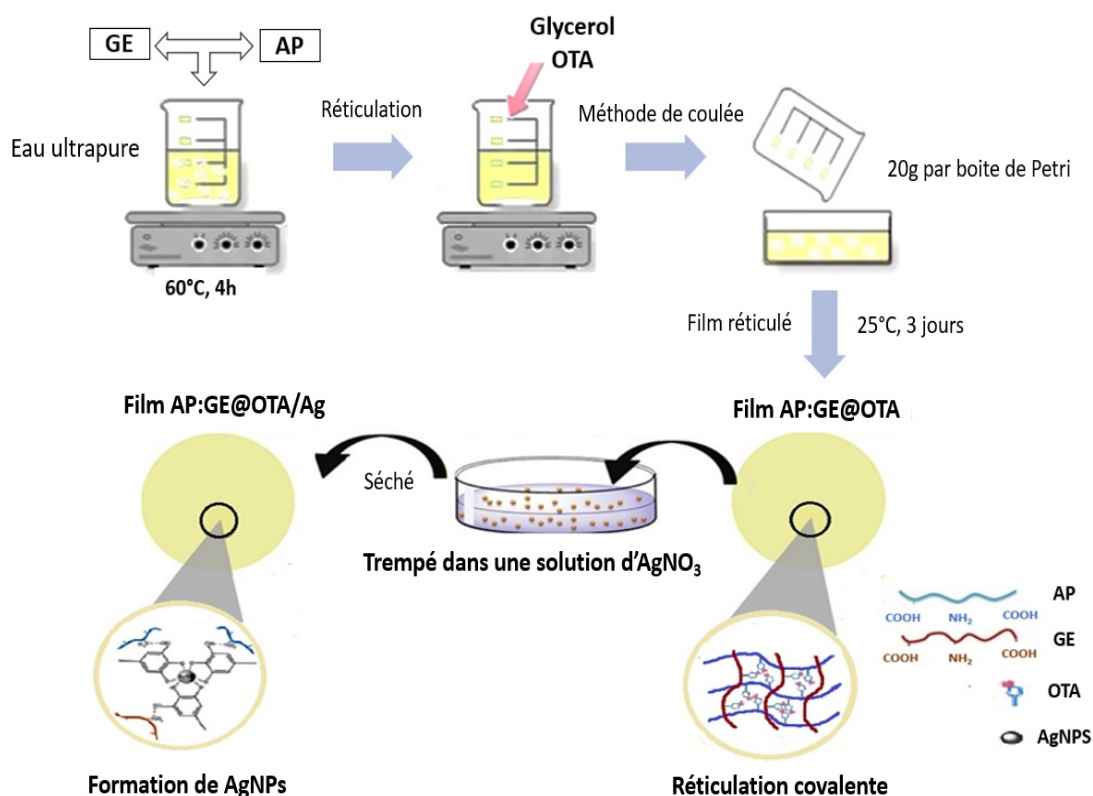


Figure 2.1 : Illustration schématique du protocole expérimental de préparation des films d'hydrogels AP:GE@OTA/Ag.

Dans les sections suivantes, les films d'hydrogels nanocomposites obtenus seront désignés par les termes suivants : AP:GE, AP:GE@OTA0.5%/Ag, AP:GE@OTA1%/Ag, AP:GE@OTA2%/Ag et AP:GE@OTA5%/Ag.

2.3.4. Quantification de la composition des films d'hydrogel :

2.3.4.1. Détermination du degré d'amidation (DA) :

Le degré d'amidation (DA) a été déterminé par la déconvolution des spectres IR-FT de la pectine amidée, spécifiquement entre 1800 et 1500 cm^{-1} . Le DA a été calculé comme le rapport de l'aire de la bande à 1667 cm^{-1} (A_{amide}) sur la somme des aires des acides galacturoniques libres, méthyl-estérifiés et amidés (A_{tot}) à 1724, 1584 et 1667 cm^{-1} , respectivement, selon l'équation suivante [208] :

$$DA (\%) = \frac{A_{\text{amide}}}{A_{\text{tot}}} \times 100 \quad (1)$$

2.3.4.2. Détermination de la teneur en amine et du degré de réticulation :

La quantification des groupes amines primaires non réticulés ($-\text{NH}_2$) dans les matrices de pectine amidée et de gélatine a été effectuée par un essai UV utilisant le réactif TNBS (l'acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzène) [209]. Le degré de réticulation a été évaluée en comparant la quantité des groupes amines primaires libres, déterminés chimiquement, avant et après la réticulation [210]. Chaque échantillon, d'une masse précise de 11 mg, a été mélangé avec une solution fraîchement préparée de TNBS, composée de 1 mL de TNBS à 0,5 % (p/v) et de 1 mL de NaHCO_3 à 4 % p/v (le bicarbonate de sodium agit comme tampon alcalin pour maintenir le pH de la solution à un niveau optimal pour la réaction). Après homogénéisation, le mélange a été incubé pendant 4 heures à 40°C pour permettre la réaction entre les groupes amine primaires libres et le TNBS. Une fois l'incubation terminée, 3 mL de HCl (6N) ont été ajoutés au mélange pour stopper la réaction. Ensuite, le mélange a été soumis à une étape d'autoclavage à 120°C pendant 1 heure, afin d'assurer une réaction complète et de favoriser la formation du complexe coloré. Après cette étape, la solution obtenue a été diluée avec 5 mL d'eau ultrapure pour réduire la concentration des réactifs et faciliter les étapes suivantes de purification. Afin d'éliminer l'excès de TNBS non réagi, le mélange a été extrait avec 8 mL d'éther éthylique pour éliminer le TNBS libre, tout en conservant les complexes formés avec les groupes amines primaires. L'éther éthylique a ensuite été évaporé en chauffant 5 mL de la solution d'échantillon dans un bain-marie pendant 15 minutes pour éliminer tout solvant résiduel. Enfin, l'échantillon a été dilué avec 15 mL

d'eau ultrapure et l'absorbance a été mesurée à 346 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu modèle UV-1900i. Dans les échantillons témoins, l'HCl a été ajouté avant le TNBS afin d'empêcher toute réaction entre le TNBS et les biopolymères, permettant ainsi de mesurer uniquement l'absorbance du complexe formé par le TNBS avec les groupes amines primaires.

La concentration de groupes amines primaires libres dans les échantillons réticulés et non réticulés a été calculée à l'aide de l'équation (2) :

$$[\text{Amines primaires libres}] \left(\frac{\text{moles}}{\text{g de matériau}} \right) = \frac{2 \cdot (\text{absorbance}) \cdot (V)}{\left(1.46 \cdot 10^4 \frac{\text{L}}{\text{mol.cm}} \right) \cdot (b) \cdot (x)} \quad (2)$$

Où le volume de la solution aqueuse contenant les échantillons hydrolysés après évaporation de l'éther est noté $V = 0,02 \text{ L}$. La valeur $1,46 \times 10^4 \text{ L/mol.cm}$ correspond au coefficient d'extinction molaire du complexe colorimétrique formé (TNP-lys). La longueur de la trajectoire optique est représentée par $b = 1 \text{ cm}$, et la variable x indique la masse de l'échantillon en grammes (g). Le degré de réticulation (f) a ensuite été déduit selon l'équation (3).

$$f(\%) = \left(1 - \frac{\text{Absorbance de l'échantillon réticulé}}{\text{Absorbance de l'échantillon non réticulé}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Chaque mesure a été réalisée en triplicata. Les échantillons non réticulés, considérés comme contenant 100 % des groupes amines libres initiaux, ont servi de référence pour estimer le pourcentage de groupes amines restants après réticulation.

2.4. Caractérisation des films d'hydrogel obtenus :

2.4.1. Analyse des propriétés structurale et élémentaire des films d'hydrogel :

Afin d'approfondir la compréhension de la structure des films d'hydrogel nanocomposites obtenus, une combinaison de techniques analytiques avancées a été utilisée, chacune apportant des informations complémentaires cruciales, en analysant à la fois leur composition chimique, leur propriétés physiques et fonctionnelles, leur organisation nanométrique et leur distribution élémentaire.

2.4.1.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF) :

Les spectres infrarouges ont été enregistrés en mode ATR (Attenuated Total Reflectance) à l'aide d'un appareil Alpha II (Bruker, Allemagne), équipé d'une platine ATR avec cristal de diamant à réflexion unique. Les mesures ont été réalisées dans une

plage de 400 à 4000 cm^{-1} , avec 32 scans et une résolution de 1 cm^{-1} , garantissant une analyse précise des liaisons chimiques détectées dans les échantillons.

2.4.1.2. Radiocristallographie par Diffraction des Rayons X (DRX) :

Un diffractomètre à rayons X (SmartLab, Rigaku Corp., Japon) a été utilisé pour analyser les propriétés cristallines de la pectine commerciale et modifiée (PE et AP) ainsi que des films d'hydrogel préparés (AP:GE@OTA et AP:GE@OTA/Ag). Le rayonnement Cu $K\alpha$, d'une longueur d'onde de 1,5444 Å, a été généré par une anode fonctionnant à 40 kV et 50 mA. Les balayages angulaires ont couvert une plage de 5° à 80°, avec des pas de 0,01°. Le système de mesure était équipé d'un goniomètre vertical θ -2 θ en configuration Bragg-Brentano, avec un détecteur à scintillation. Selon la loi de Bragg, la diffraction se manifeste lorsque la différence de trajet entre deux rayons diffractés correspond à un multiple entier de la longueur d'onde :

$$2 \times d_{hkl} \times \sin \theta = n \times \lambda \quad (4)$$

Où λ représente la longueur d'onde, θ désigne l'angle de diffraction, d la distance réticulaire, et n l'ordre de diffraction. L'analyse des pics diffractés a permis de calculer le rapport cristallin, déterminant la proportion de structure cristalline par rapport à l'amorphe.

2.4.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire du Proton (^1H -RMN) :

Pour l'analyse ^1H -RMN, les échantillons de pectines, à savoir PE et AP, ont été solubilisés séparément dans de l'eau lourde (D_2O) à une concentration de 30 mg/mL. Les spectres ont été acquis à température ambiante en utilisant un spectromètre Bruker Ascend 400 MHz (BrukerBiospin, Rheinstetten, Allemagne), permettant d'analyser les structures moléculaires des échantillons.

2.4.1.4. Microfluorescence X (micro-XRF) :

L'analyse micro-XRF a été effectuée en utilisant un spectromètre de fluorescence X microscopique XGT-9000 (Horiba-Jobin-Yvon), opérant à une tension de 50 kV, un courant de 1 mA et un faisceau ayant un diamètre de 100 μm . Les spectres micro-XRF ont été acquis à partir de la surface des films desséchés avec un pas de 10 μm dans un environnement sous vide. Les cartes élémentaires 2D générées à partir des spectres ont permis de visualiser la distribution des éléments, chaque couleur représentant un élément

spécifique et sa concentration, les zones en arrière-plan indiquant l'absence d'élément ou la présence de régions vides.

2.4.2. Examen morphologique des films d'hydrogels :

L'examen morphologique des films d'hydrogel nanocomposites a été effectué à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB), couplée à la spectroscopie de dispersion d'énergie des rayons X (EDX), ce qui permet une analyse détaillée de la topographie de surface des films et d'identifier les éventuelles hétérogénéités de composition. Par ailleurs, la microscopie électronique en transmission (MET) est utilisée pour examiner la taille, la forme et la répartition des nanoparticules d'argent au sein du réseau polymère des films d'hydrogel. Ces analyses combinées permettent d'obtenir une compréhension approfondie des caractéristiques morphologiques et nanostructurales des films nanocomposites, essentielles pour optimiser leurs performances dans des applications spécifiques.

2.4.2.1. Microscopie Électronique à Balayage associée à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X (MEB-EDX) :

Les morphologies de surfaces des films préparés ont été observées par microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie dispersive d'énergie (MEB-EDX, FEI Inspect-S50, République tchèque). Avant l'imagerie, les échantillons ont subi un processus de pulvérisation avec une couche métallique pour améliorer leur conductivité. L'analyse a été effectuée avec une tension d'accélération de 10 ou 12,5 kV.

2.4.2.2. Microscopie Électronique à Transmission (MET) :

La taille et la distribution des nanoparticules d'argent (AgNPs) au sein du film d'hydrogel AP:GE@OTA5%/Ag ont été examinées en utilisant un microscope électronique à transmission (Thermo Scientific Talos F200X FEG-STEM) fonctionnant à 200 kV. En raison de la souplesse du film à température ambiante, celui-ci a été refroidi à l'azote liquide pour durcir le film d'hydrogel tout en préservant son intégrité structurelle. Un ultramicrotome cryogénique, doté d'une lame en diamant, a permis de découper le fil d'hydrogel en sections ultrafines d'environ 50 à 100 nm d'épaisseur, garantissant une observation détaillée sans aggrégation.

2.4.3. Analyse de la résistance à la traction des films d'hydrogel :

Les propriétés de traction des films AP:GE@OTA/Ag ont été évaluées en déterminant la résistance à la traction (TS), l'allongement à la rupture (EB) et le module de Young (MY) à l'aide d'une machine de traction universelle (MTS Criterion, modèle 45, USA) conformément à la norme ASTM D-882-88 [211]. Les échantillons, mesurant $25,4 \times 150$ mm, ont été testés avec une longueur de jauge de 50 mm et une vitesse de déplacement de 50 mm/min. Cinq (05) essais ont été réalisés pour obtenir des moyennes sur la résistance à la traction, l'allongement à la rupture et le module de Young à partir des courbes contrainte-déformation.

La mesure de l'épaisseur du film a été effectuée à l'aide d'un micromètre Mitutoyo (Tokyo, Japon). Les mesures ont été réalisées à cinq endroits aléatoires sur chaque formulation de film d'hydrogel, et la moyenne des épaisseurs a ensuite été calculée.

2.4.4. Etude des propriétés barrières :

L'étude des propriétés barrières des films d'hydrogel a été menée par une série de tests visant à évaluer leur capacité d'absorption de fluide à travers un test de gonflement, permettant de quantifier l'aptitude des films à absorber et retenir des liquides, un facteur clé pour leur performance dans des applications biomédicales ou pharmaceutiques. En complément, la capacité de rétention d'eau a également été mesurée en surveillant l'humidité résiduelle des films, ce qui permet d'évaluer leur efficacité à maintenir un environnement humide, essentiel pour des applications telles que la cicatrisation des plaies ou la libération contrôlée de médicaments. Enfin, le taux de transmission de vapeur d'eau (WVTR) a été évalué pour analyser la perméabilité des films à la vapeur d'eau, fournissant des informations essentielles sur leur comportement en tant que barrières contre l'évaporation de l'eau, ce qui influence directement leur potentiel dans la gestion de l'humidité et des échanges thermiques.

2.4.4.1. Capacité d'absorption de fluide (test de gonflement) :

La capacité d'absorption de fluide des films AP:GE@OTA/Ag desséchés a été déterminée gravimétriquement [212] en triplicata, avec une précision de $\pm 5\%$. Après séchage jusqu'à un poids constant, les échantillons ont été découpés sous forme de bandes uniformes (30×30 mm²), pesés, puis immergés dans 15 mL de solution PBS (pH 7,4) à une température de 37°C. À intervalles réguliers, les bandes ont été retirées, l'excès de solution a été éliminé à l'aide de papier filtre, puis les échantillons gonflés ont été pesés

pour mesurer la variation de poids. Le taux de gonflement (%) a été calculé selon l'équation (5) basée sur le poids des échantillons gonflés (W_t) et secs (W_0) :

$$\text{Capacité d'absorption de fluide (\%)} = \left(\frac{W_t - W_0}{W_0} \right) \times 100 \quad (5)$$

2.4.4.2. Capacité de rétention d'eau (la mesure de l'humidité résiduelle) :

Pour évaluer la capacité de rétention d'eau, chaque film a été immergé dans de l'eau déionisée pendant 24 heures. Après immersion, les échantillons ont été doucement tamponnés avec du papier filtre afin d'éliminer l'excès d'eau. Les films humides ont ensuite été pesés et conservés dans un environnement ouvert ($T = 25^\circ\text{C}$, $TH = 75\%$) pendant des intervalles de temps spécifiques. La capacité de rétention d'eau a été déterminée en triplicata selon l'Équation (6) :

$$\text{Capacité de rétention d'eau (\%)} = \left(\frac{W_t}{W_0} \right) \times 100 \quad (6)$$

2.4.4.3. Taux de transmission de vapeur d'eau (WVTR) :

Cette caractérisation a été réalisée en triplicata selon la méthode gravimétrique standard ASTM [213]. Des flacons cylindriques de 34 mm de diamètre contenant 10 mL d'eau distillée ont été complètement scellés avec les échantillons, fermement fixés avec du ruban de téflon pour empêcher toute fuite de vapeur d'eau à travers les bordures. Les flacons ont été placés dans un incubateur à 37°C et 35 % d'humidité relative pendant 48 heures. La perte d'eau par évaporation à travers les films a été suivie par pesée périodique. En analysant le graphique de perte de poids par rapport au temps, le WVTR ($\text{g/m}^2/\text{jour}$) a été calculé selon l'Équation (7) :

$$\text{WVTR (g/m}^2\text{/jour)} = (\text{pente} \times 24) / A \quad (7)$$

Où A (mm^2) désigne la zone de perméation de l'échantillon.

2.4.5. Comportement thermique des films d'hydrogel :

2.4.5.1. Thermogravimétrie (TG) :

Le comportement thermique a été étudié par thermogravimétrie à l'aide d'un Q600 SDT (TA Instruments, USA). Environ 30 mg de chaque échantillon de film ont été chauffés de 25 à 600°C à une cadence de 10°C par minute sous une atmosphère azotée afin d'éliminer toute influence de l'oxydation et de favoriser une pyrolyse thermique représentative des matériaux étudiés. Cette analyse permettra de déterminer les

températures clés de décomposition (T_0 , T_{max} , masse résiduelle), fournissant des informations sur la stabilité thermique et les interactions entre les composants. Les courbes thermogravimétriques mettront en évidence les étapes successives de dégradation, facilitant l'identification des différents constituants du matériau.

2.4.6. Etude *in vitro* de la cinétique de libération de l'argent à partir des films d'hydrogel :

a) Mode opératoire :

L'évaluation de la libération de l'argent à travers les films AP:GE@OTA/Ag a été réalisée en utilisant une cellule de diffusion verticale de Franz, avec des membranes de coquille d'œuf positionnées entre les compartiments donneur et récepteur, suivant la méthodologie décrite par Gupta et al. [34]. La membrane de coquille d'œuf a été obtenue à partir d'un œuf de poulet frais. La membrane externe de la coquille d'œuf, située juste en dessous de la couche calcifiée dure, a été séparée en plongeant l'œuf dans une solution de HCl à 0,01 N pendant 6 heures pour dissoudre la couche calcifiée. Ensuite, la membrane a été soigneusement découpée pour libérer le contenu de l'œuf [214]. Elle a ensuite subi plusieurs lavages à l'eau distillée et a été maintenue dans cette eau à 4°C jusqu'à son utilisation. Les membranes ont été pré-équilibrées par immersion dans un FCS pendant 24 heures. Les pansements AP:GE@OTA/Ag (1 cm² chacun) ont été placés sur les membranes dans le compartiment donneur, assurant un contact continu avec le compartiment récepteur rempli de 30 mL de FCS (pH 7,4). Le système a été maintenu à 37°C avec agitation à 50 tr/min. À des intervalles spécifiques sur une période de 48 heures, des aliquotes de 3 mL ont été prélevées et remplacées par un volume équivalent de FCS afin de maintenir le volume du récepteur à 30 mL. La teneur en argent de chaque aliquote a été déterminée par un spectromètre d'absorption atomique à four graphite (SAAFG) (AA7000, Shimadzu, Japon) à 328,1 nm. Des étalons de calibration (de 0,5 ppm à 5 ppm) ont été élaborés à partir d'une solution mère d'argent standard à 1000 ppm pour établir une courbe de calibration. La perméation cumulative d'argent par centimètre carré de pansements a été tracée en fonction du temps d'incubation. Pour déterminer la charge totale d'argent, 20 mg de chaque formulation AP:GE@OTA/Ag ont été digérés dans 30 mL d'acide nitrique à 70 %, et un échantillon de 3 mL a été analysé via SAAFG. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. La Figure 2.2 illustre la procédure expérimentale mettant en œuvre la cellule de Franz verticale pour l'évaluation *in vitro* du profil de libération de l'argent à partir des hydrogels nanocomposites.

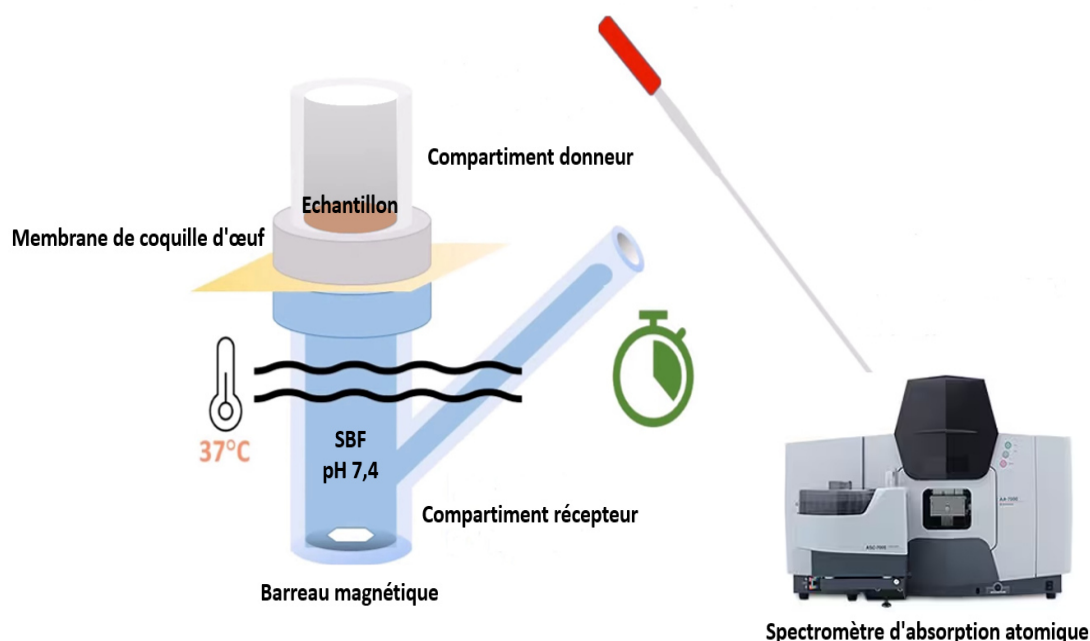


Figure 2.2 : Schéma de la cellule de Franz verticale utilisée pour l'évaluation *in vitro* de la libération de l'argent.

b) Modélisation mathématique de la cinétique de libération de l'argent :

La cinétique de libération de l'argent depuis une matrice à base de biopolymères (AP:GE@OTA/Ag) est principalement régie par un mécanisme de diffusion, où les ions d'argent migrent à travers le réseau polymère en raison de gradients de concentration. Ce phénomène de diffusion est influencé par une multitude de facteurs, notamment la porosité et la structure du réseau polymère, la taille des nanoparticules d'argent, ainsi que les propriétés physico-chimiques de la matrice, telles que son hydrophilicité et son degré de réticulation. Ce processus de libération peut être simplifié en considérant exclusivement le transfert de la substance active vers la solution aqueuse, sans prendre en compte d'autres phénomènes d'interaction complexes. Les phénomènes de diffusion sont fréquemment modélisés décrits à l'aide de diverses approches mathématiques. Parmi les modèles les plus utilisés, on distingue trois équations : le modèle d'ordre un qui décrit le processus de diffusion simple, ainsi que les modèles de Sahlin-Peppas et de Korsmeyer-Peppas, qui sont souvent utilisés pour analyser des mécanismes de libération plus complexes impliquant des facteurs, tels que la diffusion de Fick modifiée ou l'absorption du soluté.

Le modèle d'ordre un suppose que la vitesse de libération de l'argent est proportionnelle à sa concentration résiduelle dans la matrice polymérique. Il est

principalement utilisé lorsque la diffusion est le mécanisme principal, avec une libération qui suit une courbe exponentielle décroissante dans le temps.

Le modèle de Korsmeyer-Peppas est un modèle empirique utilisé pour décrire la cinétique de libération des substances actives à partir de matrices polymériques, en particulier lorsque plusieurs mécanismes de transport coexistent. Il combine la diffusion Fickienne et la relaxation de la matrice polymérique, ce qui le rend applicable aux systèmes gonflants et non gonflants. L'équation générale de ce modèle est donnée par :

$$M_t/M_\infty = K_m \times t^n \quad (8)$$

Où M_t/M_∞ représente la fraction de substance active libérée à l'instant t , K_m est une constante intégrant les propriétés du polymère et de la substance active, et n est un exposant caractéristique permettant d'identifier le mécanisme de libération. Si $n \leq 0.5$, la libération suit une diffusion purement Fickienne. Pour $0.5 < n < 1.0$, le transport devient anormal et résulte d'une combinaison de diffusion et de relaxation de la matrice. Lorsque $n=1.0$, le mécanisme est régi par une relaxation de type Cas II, caractérisée par un gonflement significatif du polymère. Enfin, si $n > 1.0$, la libération suit un mécanisme supercas II, où la relaxation polymérique joue un rôle majeur.

Le modèle de Sahlin-Peppas est une extension du modèle de Korsmeyer-Peppas, prenant en compte à la fois la diffusion Fickienne et la relaxation de la matrice polymérique, ce qui le rend particulièrement adapté aux systèmes où ces deux mécanismes sont simultanés. Son équation est donnée par :

$$M_t/M_\infty = k_1 \times t^m + k_2 \times t^{2m} \quad (9)$$

Où k_1 est une constante liée à la diffusion Fickienne, k_2 une constante associée à la relaxation polymérique de type Cas II, et m un exposant diffusionnel influençant le transport de la substance active. L'intérêt de ce modèle réside dans sa capacité à distinguer et quantifier l'influence respective de chaque phénomène sur la cinétique globale de libération.

Un autre modèle couramment utilisé est le modèle d'ordre un, qui décrit la libération d'un composé actif selon une loi exponentielle décroissante, sous l'hypothèse que la vitesse de libération est proportionnelle à la quantité restante dans le système. Ce modèle s'exprime selon l'équation :

$$\ln\left(1 - M_t/M_\infty\right) = K_1 \times t \quad (10)$$

Où K_1 est une constante de vitesse caractérisant la cinétique de libération. Il est fréquemment utilisé pour modéliser les systèmes matriciels contrôlés par diffusion, notamment dans les formulations à libération prolongée.

Ces modèles sont largement utilisés dans l'étude des systèmes de libération contrôlée, notamment dans les formulations pharmaceutiques à libération prolongée, les films polymériques destinés à des applications biomédicales ou encore les hydrogels. Le choix du modèle dépend des propriétés physico-chimiques du polymère et du principe actif ainsi que du mécanisme de transport dominant. L'ajustement des données par la méthode des moindres carrés permet ainsi d'affiner la compréhension des mécanismes sous-jacents et d'optimiser les formulations pour des applications spécifiques [215].

2.4.7. Evaluation de la cytocompatibilité des films d'hydrogel avec le test XTT :

a) Etape de préparation de la culture cellulaire :

La lignée cellulaire NIT-1 d'insulinome murin (CRL-2055) a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC), États-Unis. Les cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI-1640, supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) et 1 % de pénicilline/streptomycine, assurant un environnement nutritif optimal. L'incubation a été réalisée à 37°C dans une atmosphère contrôlée contenant 5 % de CO₂, garantissant des conditions physiologiques adéquates pour la prolifération cellulaire.

b) Test de viabilité et de prolifération cellulaires au XTT :

Les cellules NIT-1 insulinome de souris (CRL-2055) ont été utilisées pour évaluer la cytotoxicité des pansements préparés à l'aide du test XTT [216], en utilisant le kit de prolifération cellulaire XTT provenant de la société Roche (Bâle, Suisse). Les cellules NIT-1 ont étéensemencées dans une microplaque à 96 puits et incubées à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂ pendant 24 heures afin de favoriser leur attachement ainsi que leur croissance. Les pansements stérilisés (diamètre de 6 mm) ont été dissous dans du PBS, et des dilutions allant de 100 µg/ml à 12,5 µg/ml ont été préparées. Après 24 heures d'incubation, les échantillons ont été ajoutés aux puits expérimentaux en triplicata, à différentes concentrations. Les cellules ont été soumises à une incubation supplémentaire de 72 heures. À la fin de cette période, le réactif XTT a été ajouté aux puits, et la viabilité cellulaire a été déterminée par mesure de l'absorbance à 490 nm, correspondant à la formation du formazan soluble, indicateur de l'activité métabolique des cellules viables. Une mesure complémentaire de l'absorbance à 660 nm a été effectuée pour corriger l'interférence de fond liée aux impuretés ou aux variations optiques du milieu. L'intensité

du signal mesuré à 490 nm, après soustraction de la valeur obtenue à 660 nm, a permis de quantifier précisément la viabilité cellulaire, qui a été calculée selon l'équation suivante [217] :

$$\text{Viabilité des cellules (\%)} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon}}{\text{Absorbance du groupe control}} \times 100 \quad (11)$$

2.4.8. Test d'activité antibactérienne :

Pour l'évaluation du pouvoir antibactérien, 37 grammes de milieu déshydraté ont été suspendus dans 1 litre d'eau distillée. Le mélange a été chauffé lentement sous agitation jusqu'à ébullition, permettant une dissolution complète du milieu. Le milieu a ensuite été réparti dans des flacons et stérilisé par autoclave à une pression de 1,03 Bar et une température comprise entre 121 et 124°C, pendant 15 minutes. La solution a été versée dans des boîtes de Pétri stériles, en veillant à obtenir une couche d'environ 4 mm d'épaisseur.

L'efficacité antibactérienne des formulations AP:GE, AP:GE@OTA et AP:GE@OTA/Ag a été évaluée par une méthode de la zone d'inhibition, en utilisant des souches de *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram-positif, ATCC 6538) et *Escherichia coli* (bactérie Gram-négatif, ATCC 8739). Chaque échantillon a été découpé en disques de 6 mm de diamètre, puis stérilisé sous lampe UV pendant 1 heure pour éliminer toute contamination. Les disques sont ensuite été placés sur des milieux de culture LB agar fraîchement préparés, préalablement inoculés avec 100 µL d'une suspension bactérienne (10^8 UFC/mL) répartie uniformément. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, le diamètre des zones d'inhibition autour de chaque échantillon, indiquant l'activité antibactérienne, a été mesuré à l'aide du logiciel ImageJ, à partir d'images numériques des plaques [218]. L'expérience a été réalisée en triplicata dans une enceinte de biosécurité.

2.4.9. Evaluation de la compatibilité sanguine (tests d'hémocompatibilité) :

a) Essais d'hémolyse :

Pour évaluer l'hémocompatibilité des pansements préparés, des essais d'hémolyse ont été effectués. Les globules rouges humains (GRH) ont été isolés par centrifugation pour éliminer le sérum, suivie de cinq lavages avec du PBS, comme décrit par l'étude de Wang et al. [38]. Les GRH ont été dilués par un facteur de 10 avec du PBS. Ensuite, 2 mL de la suspension diluée de GRH ont été distribués dans des flacons d'échantillons de 5 mL contenant 1 mg de chaque pansement (AP:GE, AP:GE@OTA0.5%,

AP:GE@OTA5%, et AP:GE@OTA0.5%/Ag, AP:GE@OTA5%/Ag). Deux flacons témoins ont été inclus : un contenant 0,4 mL de GRH dilués dans 1,6 mL d'eau (témoin positif), et un autre avec 1,6 mL de PBS (témoin négatif). Après incubation à 37°C pendant 2 heures, les échantillons ont été centrifugés à 10 000 rpm pendant 1 minute, et l'absorbance (A) des surnageants a été mesurée à 541 nm avec un spectrophotomètre (Shimadzu modèle UV-1900i). Le pourcentage d'hémolyse (PH) a ensuite été calculé comme suit [219] :

$$PH (\%) = \frac{(A_{\text{échantillon}} - A_{\text{témoin négatif}})}{(A_{\text{témoin positif}} - A_{\text{témoin négatif}})} \times 100 \quad (12)$$

b) Test d'indice de coagulation sanguine (BCI):

L'indice de coagulation sanguine (BCI) a été mesuré selon la méthode de coagulation cinétique, décrite par Wang et al. [220]. Les films préparés et le pansement commercial Hydrocoll® ont été découpés en disques (diamètre de 6 mm) et stérilisés sous lumière UV pendant 1 heure, suivis de trois rinçages avec du PBS. Les échantillons ont été placés dans des béchers, et 0,25 mL de sang humain ACD fraîchement collecté ont été ajoutés, suivis de 0,02 mL de CaCl₂. Après incubation à 37°C pendant 10, 20, 30 et 50 minutes, 50 mL d'eau distillée ont été ajoutés à chaque intervalle de temps. Après incubation à 37°C pendant 10, 20, 30 et 50 minutes, 50 mL d'eau distillée ont été ajoutés séquentiellement à chaque point temporel. Après une incubation supplémentaire de 5 minutes, le sang hémolysé a été recueilli et mesuré à 542 nm. Chaque essai a été réalisé en triplicata. Le BCI a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$BCI (\%) = \left(\frac{\text{Absorbance du sang en contact avec l'échantillon}}{\text{Absorbance du sang ACD dans l'eau distillée}} \right) \times 100 \quad (13)$$

2.4.10. Études de cicatrisation *in vivo* :

a) Essai de Heite-Marcy :

Le modèle expérimental proposé initialement par Heite en 1953, puis optimisé par Marcy, représente un protocole de référence pour l'étude de l'excision cutanée. Ce modèle, adapté pour observer le processus de cicatrisation épidermique, particulièrement la ré-épithélialisation, repose sur une méthode rigoureusement standardisée. Elle comprend l'utilisation d'un emporte-pièce pour réaliser une excision dans la région cervico-dorsale dans des conditions strictement aseptiques. Cette procédure est suivie d'une analyse clinique et histologique détaillée visant à comprendre les mécanismes de

la régénération tissulaire et à mesurer l'efficacité des processus de cicatrisation cutanée [221].

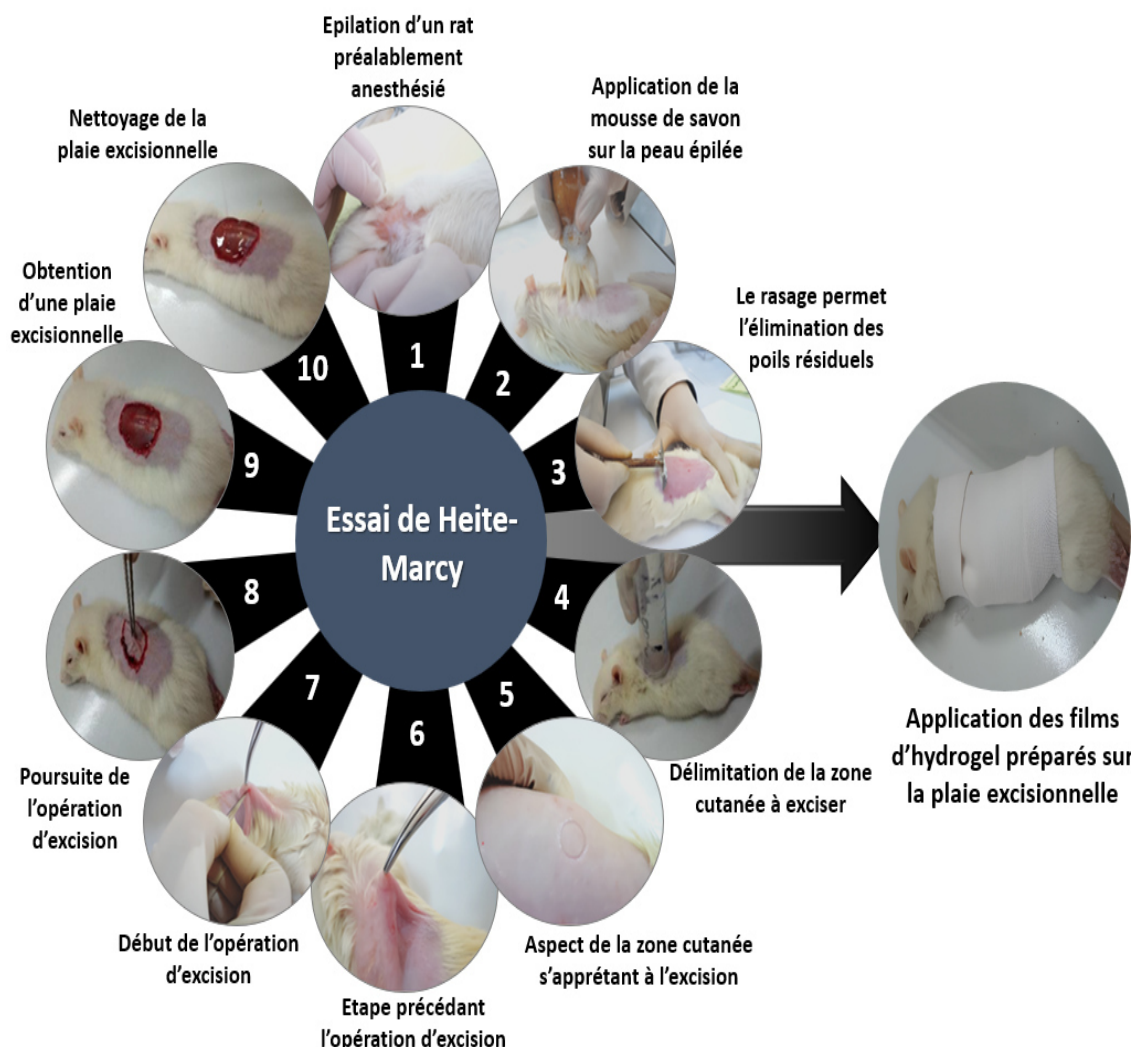


Figure 2.3 : Illustration du modèle d'étude excisionnelle de Heite-Marcy.

b) Protocole expérimental :

• **Matériel biologique :**

L'expérimentation a été réalisée sur des rats albinos Wistar mâles, âgés de six mois et pesant 200 ± 20 grammes. Ces animaux ont été fournis par le Service Pharmacotoxicologie du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP). L'alimentation des rats était assurée par des granulés spécialement formulés pour les rongeurs, avec un accès libre à de l'eau de robinet. Un cycle lumineux de 12 heures de lumière suivi de 12 heures d'obscurité a été maintenu tout au long de l'étude, dans un environnement contrôlé avec une température ambiante de 22°C et un taux d'humidité relatif fixé à 50%.

- **Création de groupes et organisation des animaux en lots :**

Les vingt-huit (28) rats albinos Wistar mâles, âgés de 6 mois et pesant 200 ± 20 g, ont été répartis de manière randomisée en quatre groupes homogènes de sept rats chacun, placés en stabulation individuelle :

- Groupe I : Témoin positif (Plaie + Pansement Hydrocoll®),
- Groupe II : Plaie + Pansements AP:GE,
- Groupe III : Plaie + Pansements AP:GE@OTA5%,
- Groupe IV : Plaie + Pansements AP:GE@OTA0.5%/Ag.

- **Préparation des animaux :**

Avant toute procédure chirurgicale, les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de thiopental sodique à une dose de 50 mg/kg, administrée 24 heures avant l'excision. Cette anesthésie a été utilisée pour minimiser la souffrance des animaux et faciliter les manipulations nécessaires. Les rats ont ensuite été rasés dans la zone cervico-dorsale, conformément aux recommandations éthiques en vigueur. Ce rasage a été suivi d'une désinfection de la zone à l'éthanol à 70% pour garantir un environnement stérile.

- **Excision cutanée :**

Les procédures impliquant les animaux ont été menées en respectant les directives de l'Association Algérienne des Sciences en Expérimentation Animale (AASEA), et ont reçu l'approbation préalable du Comité d'Éthique de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), sous le numéro d'accord 45/DGLPAG/DVA.SDA.14. Les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de thiopental à une dose de 40 mg/kg, administrée dans un volume de 0,5 mL. La zone cervico-dorsale des rats a ensuite été rasée et désinfectée à l'éthanol à 70 % pour assurer une asepsie maximale.

Afin de minimiser la souffrance animale et de faciliter les manipulations, une anesthésie générale au thiopental (40 mg/kg) a été réalisée, suivie d'un rasage soigneux de la région cervico-dorsale. Le rasage a été complété à l'aide d'une lame pour éliminer les poils restants, et la peau a été stérilisée avec de l'éthanol à 70 % pour détruire les germes.

À l'aide d'une lame chirurgicale et de pinces, des plaies circulaires de 3 cm de diamètre ont été créées sur toute l'épaisseur de la peau dans des conditions strictement aseptiques. Le sang en excès a été absorbé à l'aide de compresses stériles, et les marges de la plaie ont été nettoyées avec de l'alcool chirurgical. Pour soulager la douleur post-opératoire, une injection de 10 mg de paracétamol par voie intrapéritonéale a été administrée. Ensuite, les plaies ont été recouvertes de différents pansements fraîchement préparés : AP:GE, AP:GE@OTA5% et AP:GE@OTA0.5%/Ag, tandis que le groupe témoin positif recevait des pansement hydrocolloïdes (Hydrocoll®). Les pansements ont été changés quotidiennement.

- **Euthanasie des animaux :**

L'euthanasie des rats a été réalisée par inhalation d'éther aux jours J3, J8, et au jour final de cicatrisation complète. Cette méthode a été choisie pour minimiser la souffrance des animaux. Après euthanasie, les tissus cicatriciels ont été prélevés et fixés immédiatement dans une solution de formol à 10% en vue d'une analyse histologique détaillée, afin d'évaluer les effets des différents traitements sur la cicatrisation cutanée.

c) Analyse comparative de la progression de la cicatrisation des plaies :

La progression de la cicatrisation des plaies a été suivie et documentée par photographie numérique aux 2^{ème}, 4^{ème}, 6^{ème}, 8^{ème}, 10^{èmes} et 12^{èmes} jours postopératoires. Tout au long de cette période, les rats ont été manipulés avec douceur pour minimiser le stress et les acclimater à l'environnement du laboratoire. L'évaluation des surfaces des plaies a été réalisée grâce au logiciel Image J, et le pourcentage de contraction des plaies, également appelé taux de cicatrisation (T), a été déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$T (\%) = \frac{\text{surfaces initiales des plaies} - \text{surfaces des plaies à } J_x}{\text{surfaces initiales des plaies}} \times 100 \quad (14)$$

Les résultats sont fournis sous la forme de valeurs moyennes accompagnées de leurs écart-types.

d) Examen histologique des processus de régénération tissulaire :

- **Protocole histologique :**

Les tissus cicatriciels, fixés dans une solution de formol à 10%, ont été soumis à un protocole de déshydratation et d'inclusion en paraffine pour préserver les structures tissulaires en vue d'une analyse microscopique. La déshydratation a commencé par un bain d'alcool éthylique à 70° pendant 30 minutes, suivi de bains successifs à 80° et 90°,

chacun durant 30 minutes, pour éliminer progressivement l'eau. Les échantillons ont ensuite été immergés dans trois bains d'alcool à 100° pendant 30 minutes chacun, assurant une déshydratation complète.

Pour faciliter l'inclusion en paraffine, les tissus ont été traités par quatre bains de toluène de 30 minutes chacun, permettant l'élimination des lipides. Les tissus ont ensuite été imprégnés de paraffine fondue à 58°C dans deux bains successifs de 2 heures, ce qui a permis de les durcir et de les préparer à la coupe.

Les sections tissulaires de 4 µm ont été découpées au microtome Leica CM1900 Leica CM1900 (Leica, Heidelberg, Allemagne), puis soumises à deux méthodes de coloration classiques en histologie, à savoir la coloration Hématoxyline-Éosine (H&E) et le trichrome de Masson, afin de mettre en évidence les différentes structures cellulaires et tissulaires. La coloration Hématoxyline-Éosine a permis de visualiser les noyaux cellulaires et les cytoplasmes, tandis que le trichrome de Masson a permis de différencier les fibres de collagène, facilitant ainsi l'analyse détaillée du processus de cicatrisation.

- **Protocole de coloration à l'Hématoxyline-Eosine (H&E) :**

L'hématoxyline, un colorant basique, colore les structures acides en bleu violacé, tandis que l'éosine, un colorant acide, teinte les structures basiques en rouge ou rose. Lorsqu'elle est appliquée sur des cellules animales, la coloration H&E colore les noyaux en bleu violet et les cytoplasmes en rose ou rouge [222].

Le protocole de coloration commence par le déparaffinage et la réhydratation des coupes de tissu, afin d'éliminer la paraffine et de préparer les échantillons à l'environnement aqueux. Les échantillons sont ensuite immergés dans une solution d'hématoxyline de Groat pendant 4 minutes, ce colorant basique se fixant sur les noyaux cellulaires, qui deviennent bleu-violet. Après cette incubation, les échantillons sont rincés à l'eau jusqu'à obtenir un virage au bleu brun, ce qui garantit l'élimination de l'excès de colorant (voir annexe).

Les coupes sont ensuite colorées à l'éosine pendant 30 secondes, ce colorant acide marquant les structures basiques comme le cytoplasme et le collagène, qui apparaissent rosés. Après cette étape, les échantillons sont rincés à l'eau distillée pendant une minute pour stabiliser la coloration et éliminer tout excédent.

Enfin, les coupes sont déshydratées à travers des bains d'alcool à concentration croissante, puis montées avec du baume de Canada pour préserver les échantillons, permettant une observation microscopique optimale.

- **Protocole de coloration au Trichrome de Masson :**

Également connue sous le nom de "coloration du tissu conjonctif", cette technique met en évidence les composants du tissu de soutien, en particulier le collagène. Le trichrome utilise trois couleurs : les noyaux et autres structures basophiles sont colorés en bleu, le collagène en bleu ou vert (selon la variante de la technique), et les cytoplasmes, le muscle, les hématies et la kératine en rouge vif [222].

Le protocole débute par le déparaffinage et l'hydratation des coupes de tissu, en préparation pour les colorations suivantes. Les échantillons sont d'abord immergés dans une solution d'héματοxyline de Groat pendant 2 à 5 minutes, afin de colorer les noyaux cellulaires en bleu-violet. Après cette étape, les coupes sont lavées à l'eau courante pendant 5 minutes pour éliminer l'excès de colorant (voir annexe).

Les échantillons sont ensuite traités avec un mélange fuchine-ponceau pendant 5 minutes, ce qui colore le cytoplasme en rouge. Après un rinçage rapide à l'eau acétique, les coupes sont colorées à l'orangé G molybdique pendant 5 minutes, afin de marquer les fibres de collagène en orange. Un autre rinçage à l'eau acétique suit cette étape.

Le processus se termine par une coloration au vert lumière pendant 5 minutes, ce qui permet de mettre en évidence les éléments extracellulaires. Après un dernier lavage à l'eau acétique, les échantillons sont déshydratés à travers des bains d'alcool, puis montés pour une observation microscopique de qualité.

En résumé, l'ensemble des étapes relatives à l'étude in-vivo de la cicatrisation des plaies, telles que décrites précédemment, est synthétisé dans le schéma récapitulatif présenté à la Figure 2.3. Ce diagramme résume de manière visuelle et structurée les procédures suivies lors de l'excision des plaies, les démarches de l'étude clinique et les étapes de l'étude histologique.

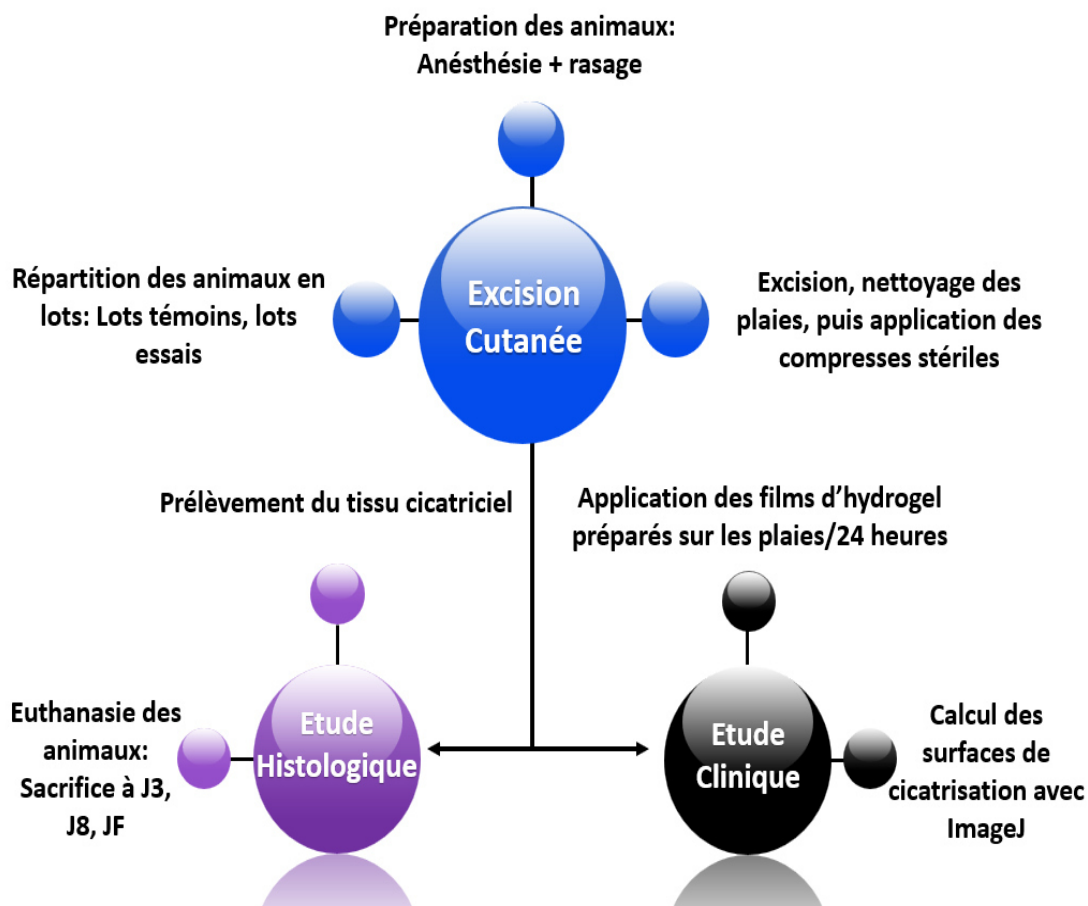


Figure 2.4 : Schéma récapitulatif de l'étude *in vivo*.

2.4.11. Analyse statistique :

L'analyse des données expérimentales a été réalisée grâce au logiciel SPSS Statistics, version 26, de la société américaine IBM Corp. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été effectuée avec un niveau de confiance fixé à 95 % afin de déterminer les variations significatives entre les groupes. Pour affiner la comparaison des moyennes et identifier les différences significatives, un test post-hoc de Tukey a été appliqué. Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme seuil de signification statistique.

L'analyse statistique joue un rôle crucial dans ce type d'étude en offrant des preuves quantitatives solides permettant de confirmer ou de rejeter les hypothèses avancées. L'utilisation de la valeur p , avec un seuil de signification statistique de $p < 0,05$, permet d'évaluer la probabilité que les différences observées entre les groupes soient le résultat du hasard. Cette démarche statistique est donc indispensable pour assurer la validité des résultats expérimentaux, en renforçant la crédibilité des conclusions tirées. Elle permet aussi d'interpréter les données de manière objective, en fournissant une évaluation précise des effets des traitements appliqués et de leur influence sur la cicatrisation des plaies.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Introduction :

Dans le cadre de cette thèse, nous avons conduit une exploration approfondie des propriétés physicochimiques, biologiques et fonctionnelles de nouveaux pansements élaborés à partir de biopolymères sous forme d'hydrogels nanocomposites, afin de relever les défis complexes liés à la cicatrisation des plaies. Ce chapitre présente une synthèse des principaux résultats obtenus au cours de cette étude, structurée en deux axes majeurs pour une analyse exhaustive et cohérente.

Le premier axe porte sur l'analyse des propriétés physicochimiques, structurales et morphologiques des films AP:GE, AP:GE@OTA et AP:GE@OTA/Ag. Cette section met en lumière :

- La caractérisation physicochimique de la pectine amidée (AP), obtenue par une modification chimique de la pectine commerciale, accompagnée de la détermination précise de son degré d'amidation.
- La quantification des amines primaires libres et la mesure du degré de réticulation, permettant d'évaluer l'efficacité des processus de réticulation appliqués.
- La confirmation de la dispersion homogène et de la stabilisation des nanoparticules d'argent (AgNPs) dans la matrice hydrogel, soulignant une maîtrise des interactions nanostructurales.
- L'évaluation des propriétés mécaniques, thermiques et barrières des films, en vue d'optimiser leur performance pour des applications en milieu biomédical.

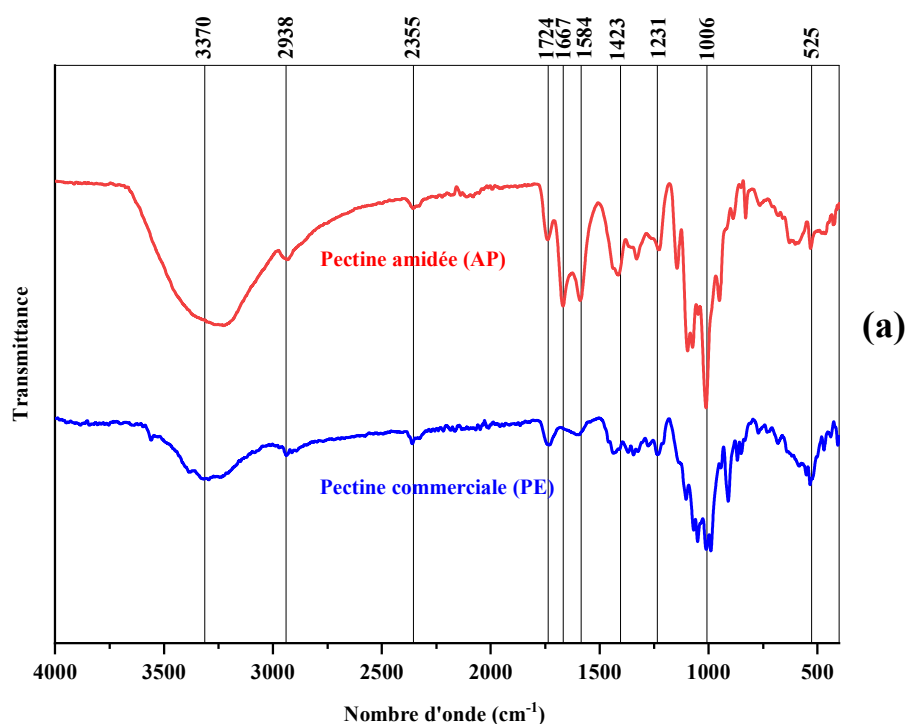
Le second axe est consacré à l'étude des performances biologiques et fonctionnelles des films d'hydrogels nanocomposites pour la cicatrisation des plaies, à travers :

- La libération contrôlée et prolongée de l'argent à partir des films, modélisée à l'aide d'approches mathématiques.

- Les tests de viabilité et de prolifération cellulaires (XTT), validant la biocompatibilité des formulations élaborées.
- L'analyse de l'activité antibactérienne des films, mettant en évidence leur efficacité significative contre des pathogènes courants des plaies infectées.
- L'évaluation de la compatibilité sanguine, démontrant que ces matériaux n'induisent pas d'hémolyse et présentent une sécurité accrue pour une application *in vivo*.
- Les études *in vivo* sur des modèles animaux, pour démontrer l'accélération du processus de régénération cutanée, à travers une réduction rapide de la surface des plaies et une restauration efficace des tissus, soutenue par des comparaisons pertinentes avec des matériaux de référence.

3.2. Résultats de la caractérisation de la pectine amidée (AP) :

La pectine commerciale (PE) a été modifiée chimiquement par une réaction d'amidation pour obtenir de la pectine amidée (AP). La Figure 3.1(a) illustre les spectres IR-TF des pectines non amidée et amidée.



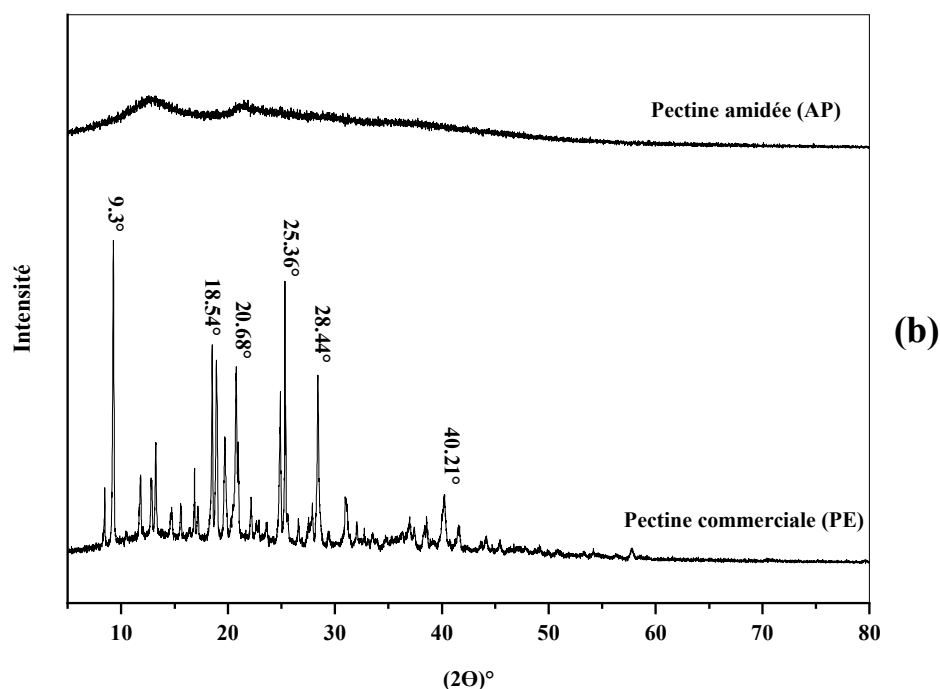


Figure 3.1 : Spectres IR-TF (a) et diffractogrammes des rayons X (b) des échantillons de PE et AP.

Dans le spectre de la PE, un pic se manifeste à 3370 cm^{-1} , indiquant la vibration d'étirement des groupes hydroxyles (-OH). Le pic à 2932 cm^{-1} est attribué à la vibration d'étirement des liaisons C-H, tandis que celui à 1724 cm^{-1} reflète l'étirement des esters méthyliques. Les pics situés à 1436 cm^{-1} et 1340 cm^{-1} sont respectivement liés aux vibrations de cisaillement -CH₂ et à la flexion -OH [223]. Le pic à 1006 cm^{-1} est attribué aux liaisons glycosidiques entre deux unités de sucre galacturonique [224].

Le spectre IR-TF de l'AP montre un élargissement significatif du pic à 3370 cm^{-1} , lié à la présence des groupes N-H des amides et aux groupes O-H, apparaissant à la même fréquence [225]. Les pics à 1667 cm^{-1} , correspondant à l'amide-I, et à 1584 cm^{-1} , associé à l'amide-II sont dus au dopage électronique des groupes -NH₂, en accord avec le pic IR-TF observé à 1590 cm^{-1} [208]. De plus, le spectre de l'AP présentait également un pic faible à environ 1423 cm^{-1} , suggérant que le groupe amide avait été incorporé avec succès dans les molécules de pectine. Le degré d'amidation calculé par déconvolution des spectres IR-TF de l'AP est de $38,62 \pm 0,04\%$ (voir annexe).

La Figure 3.1(b) présente les diffractogrammes RX de la PE et de l'AP. La PE non modifiée montre des pics bien définis à des angles 2θ de 9° , $18,54^\circ$, $20,68^\circ$ et $40,21^\circ$, ce qui reflète sa nature semi-cristalline. En revanche, l'AP présente deux pics faibles et

larges autour de $13,34^\circ$ et 20° (2θ), suggérant que l'incorporation des groupes $-NH_2$ pourrait avoir entravé le réarrangement des chaînes moléculaires de pectine, causant la perturbation de sa structure cristalline.

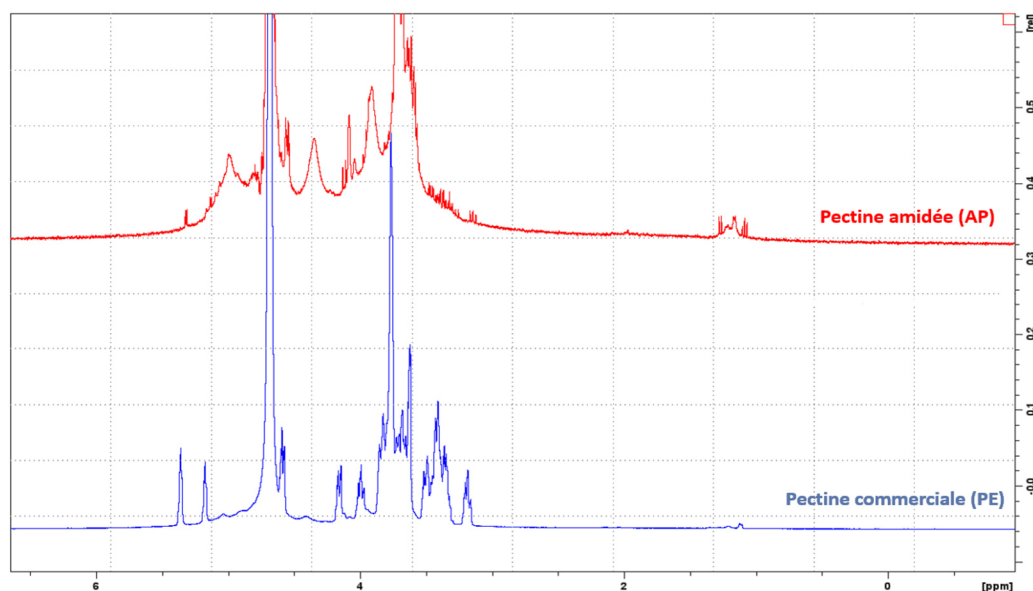


Figure 3.2 : Spectres 1H -RMN des échantillons de PE et AP solubilisés dans D_2O .

La Figure 3.2 illustre les spectres 1H -RMN de la PE et de l'AP. Le spectre de l'AP révèle des pics proéminents dans la plage de 3 à 5,5 ppm, correspondant aux hydrogènes de la chaîne d'acide polygalacturonique [226]. Le pic intense entre 3 et 4 ppm est attribué aux protons méthyle de l'amine primaire insérée dans les chaînes de PE, indiquant une méthylation partielle des groupes méthoxy dans la pectine [225]. Cela confirme la réussite de l'amidation de la pectine.

Les analyses spectroscopiques (IR-TF, DRX, 1H -RMN) démontrent que la PE a été fonctionnalisée avec succès par l'incorporation de groupes amines primaires, aboutissant à la formation de l'AP. La réaction d'amidation de la pectine est illustré sur la figure suivante :

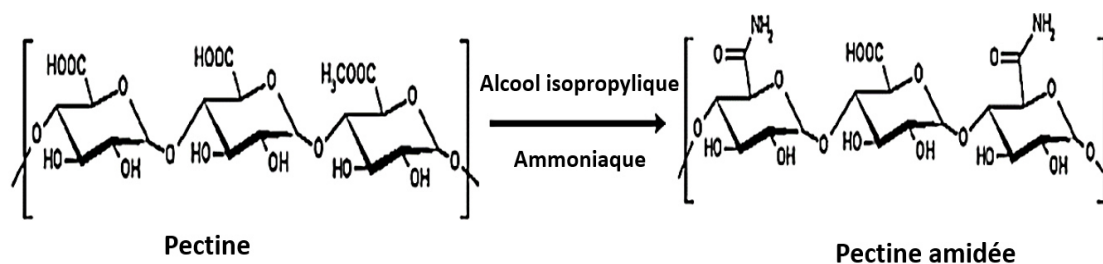


Figure 3.3 : Réaction d'amidation de la pectine.

3.3. Caractérisation physicochimique des films élaborés :

Les films d'hydrogels, élaborés à partir de la pectine amidée, de la gélatine, réticulées avec de l'acide tannique oxydé (AP:GE@OTA) ont été développés en premier lieu par réticulation covalente entre les groupes amine de l'AP et de la GE avec les sites réactifs du groupe carbonyle de l'OTA. Ensuite, dans un environnement alcalin, les hydroxyles phénoliques de l'OTA ont servi d'agents réducteurs naturels pour les ions argent, menant à la formation de nanoparticules d'argent (AgNPs). Parallèlement, les groupes carbonyle présents sur l'OTA forment des liaisons de coordination avec les AgNPs, générant une barrière protectrice qui retarde la libération des ions Ag^+ et empêche l'interaction directe entre les cellules et les AgNPs [207]. Les films d'hydrogel obtenus sont illustrés sur la Figure 3.4, tandis que les mécanismes de leur formation sont décrits dans le schéma de la Figure 3.5.

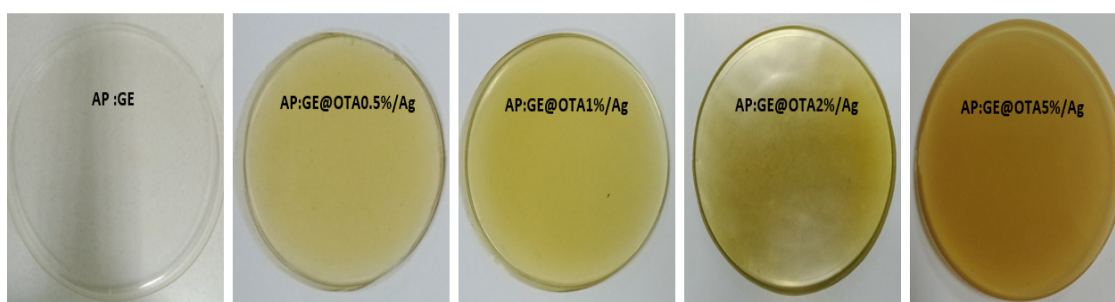


Figure 3.4 : Images numériques des films d'hydrogel nanocomposites élaborés.

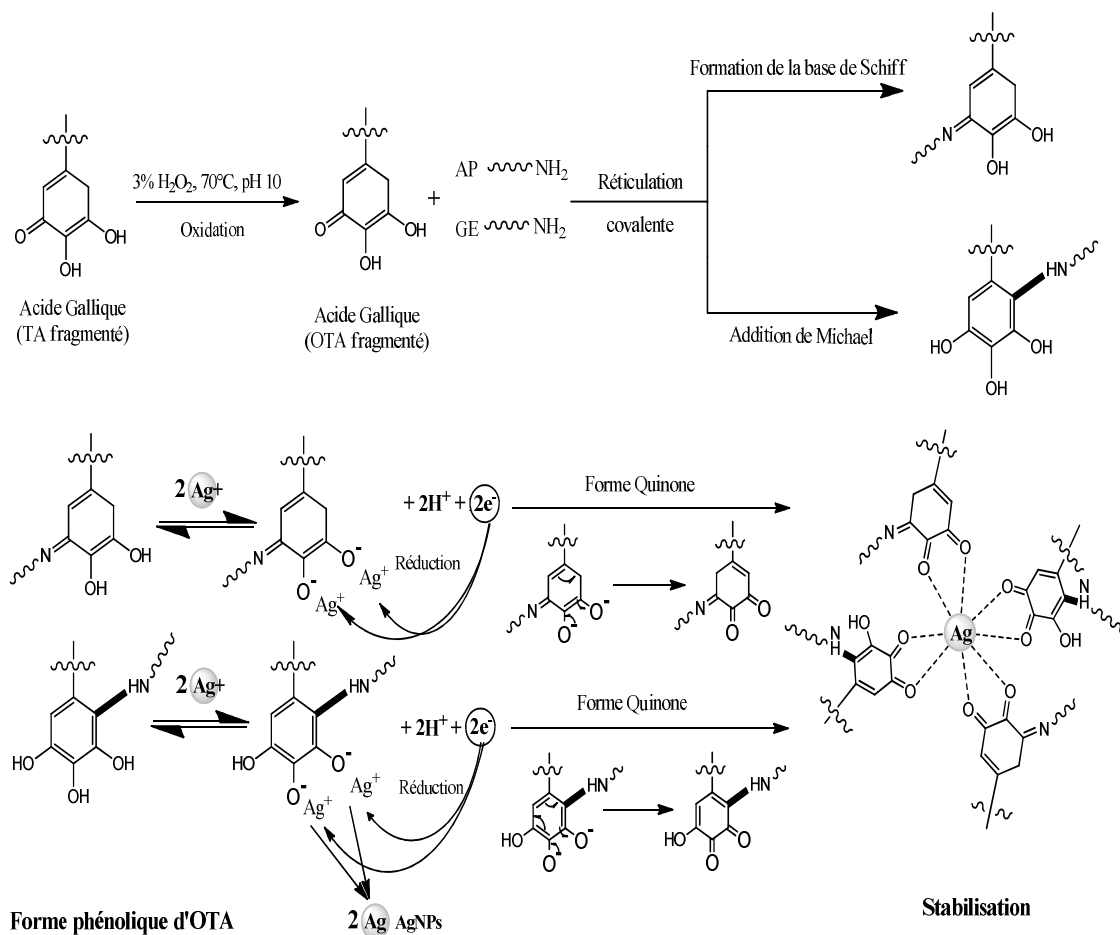


Figure 3.5 : Mécanisme réactionnel impliqué dans le processus de synthèse des films AP:GE@OTA/Ag.

3.3.1. Détermination de la teneur en amines primaires libres et du degré de réticulation:

La réaction au TNBS (acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzène) a été employée pour la quantification spécifique des groupes amines dans les protéines, les produits alimentaires et les peptides [227]. Le degré de réticulation a été évalué en mesurant chimiquement la variation de la quantité de groupes amines libres avant et après réticulation, en supposant que chaque groupe amine perdu participe à la formation d'une liaison de réticulation. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3.1, qui illustre les valeurs des groupes amine libres par gramme de matériau avant et après réticulation, ainsi que le degré de réticulation des films préparés.

Tableau 3.1. Nombre de moles de groupes amines libres dans les matrices polymériques, ainsi que le degré de réticulation.

Échantillons		Nombre de moles de groupes amines libres par gram d'échantillon ($\times 10^5$)	Degré de réticulation (%)
Avant réticulation	GE	$31,8 \pm 1,35$	-
	AP	$8,5 \pm 0,75$	-
	AP:GE	$37,3 \pm 1,51$	-
Après réticulation	AP:GE@OTA0.5%	$30,2 \pm 1,50$	$19,03 \pm 4,04$
	AP:GE@OTA1%	$21,3 \pm 1,77$	$42,89 \pm 4,76$
	AP:GE@OTA2%	$15,6 \pm 1,00$	$58,52 \pm 2,68$
	AP:GE@OTA5%	$8,1 \pm 1,67$	$78,27 \pm 4,47$

Remarque : Les résultats présentent la moyenne de trois déterminations $\pm$ l'écart-type.

La quantité de groupes amines libres dans la gélatine (GE) était similaire à celle observée dans des études antérieures [228, 229], et dépassait celle des échantillons de la pectine amidée (AP), elle est de $31,8 \pm 1,35 \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$ comparée à $8,5 \pm 0,75 \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$. Après réticulation, une diminution significative du nombre de groupes amines libres a été constatée dans les matrices d'AP et de GE, confirmant le rôle actif des groupes amines, très nucléophiles, dans la réticulation du film.

Nous avons également étudié l'effet de la concentration en OTA sur le mécanisme de réticulation.

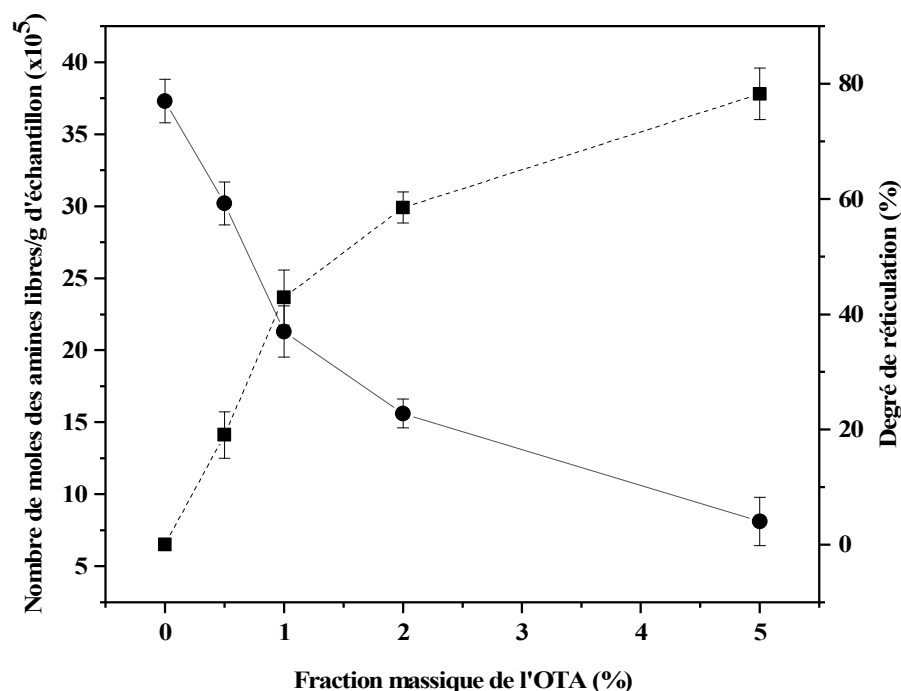


Figure 3.6 : Effet de la concentration en OTA sur le nombre des groupes amine libres (●) ainsi que sur le degré de réticulation (■) dans les matrices polymériques.

La figure 3.6 montre qu'une augmentation de la teneur en OTA a entraîné une consommation accrue des groupes amine. Après réticulation, une réduction du nombre de groupes amine libres a été observée dans tous les films AP:GE@OTA, variant de 7,1 à $29,2 \times 10^{-5} \text{ mol.g}^{-1}$. Par conséquent, le degré de réticulation a augmenté, atteignant respectivement 58,52 % pour AP:GE@OTA2% et 78,27 % pour AP:GE@OTA5%.

3.3.2. Résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (IR-TF) :

Tout d'abord, nous avons réalisé une analyse IR-TF pour confirmer l'oxydation de l'acide tannique. À cet effet, la figure suivante montre le spectre infrarouge obtenu, mettant en évidence les caractéristiques spectrales distinctives des groupes fonctionnels résultant de ce processus d'oxydation.

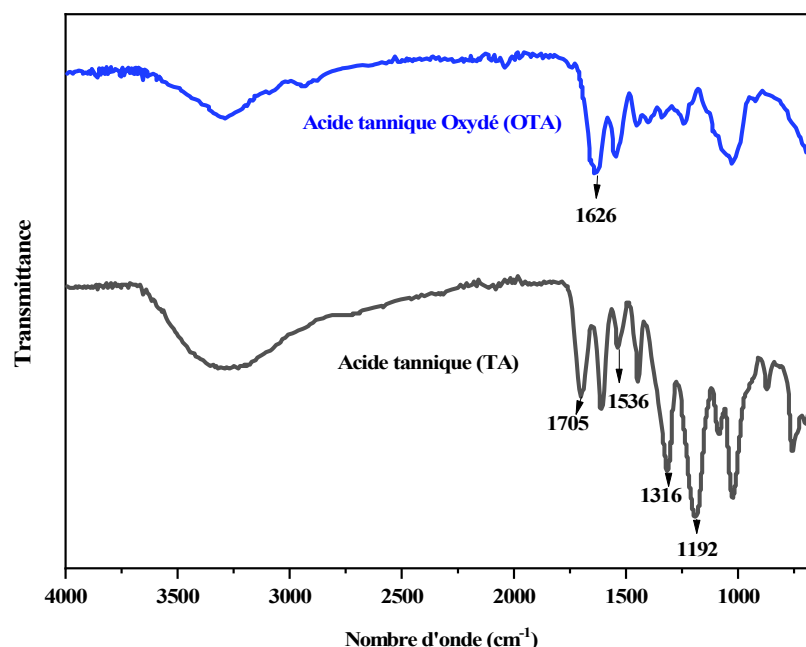


Figure 3.7 : Spectres IR-TF de TA et d'OTA.

La Figure 3.7 présente les spectres IR-TF du TA et de l'OTA. Pour le TA, les pics détectés entre 3200 et 3700 cm^{-1} , ainsi qu'aux alentours de 1316 cm^{-1} , sont attribués à la vibration d'étirement des groupes hydroxyles phénoliques. Les pics observés à 1192 cm^{-1} et 1536 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'étirement des liaisons C=O et C=C dans le cycle aromatique. Le pic détecté à 1023 cm^{-1} est lié à la vibration d'étirement des liaisons éther (C-O-C).

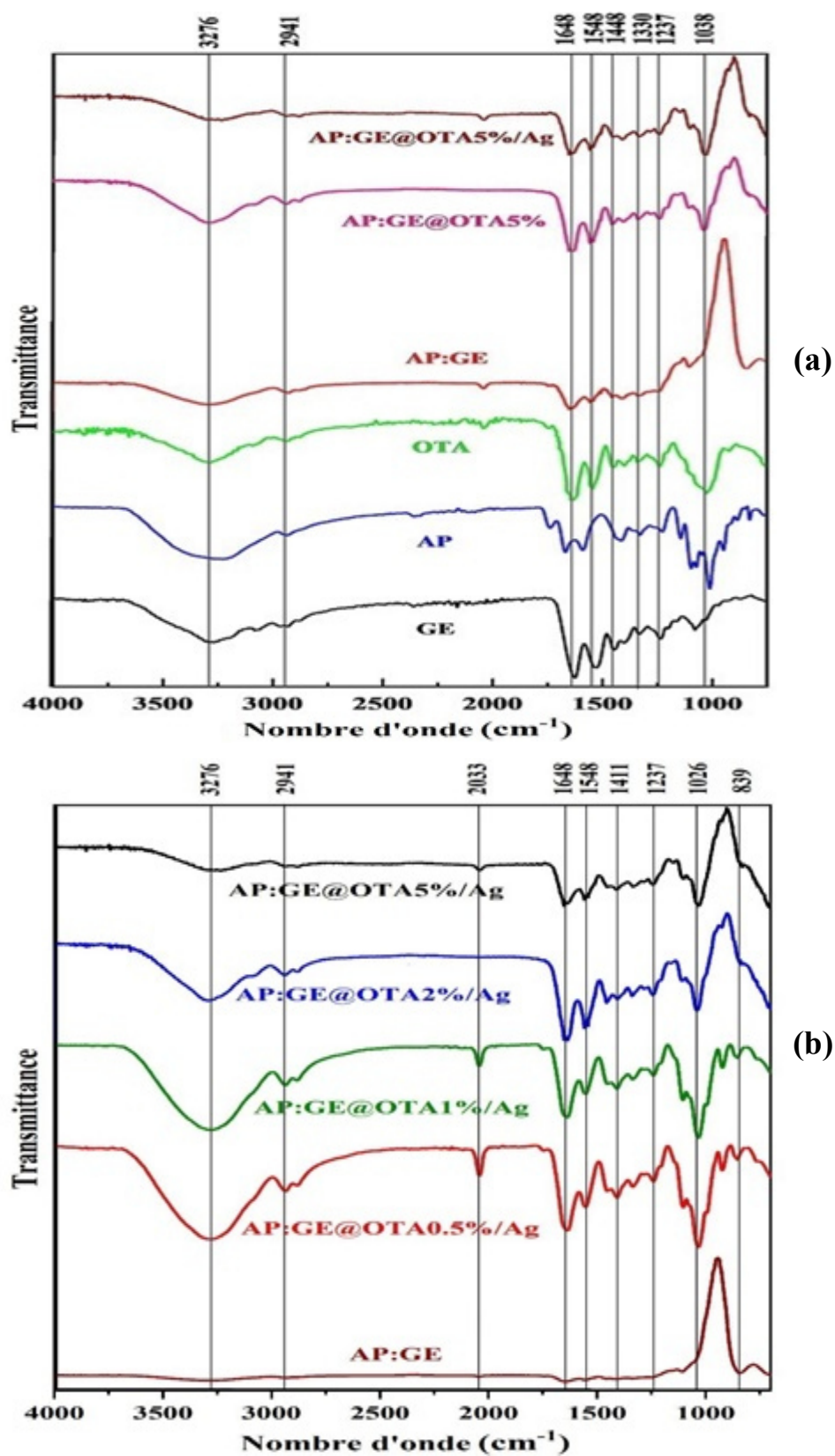


Figure 3.9 : Spectres IR-TF : (a) Films AP:GE@OTA5%/Ag préparés en l'absence et en présence d'OTA et de AgNPs ; (b) Films AP:GE@OTA/Ag avec différentes concentrations d'OTA.

La Figure 3.9(a) montre que les échantillons de GE présentent des pics de transmittance distincts entre 3320 cm^{-1} et 3520 cm^{-1} , attribués à l'établissement des liaisons hydrogène entre l'amide-A et l'eau. En outre, des pics à 1630 cm^{-1} correspondant à l'amide-I, à 1330 cm^{-1} pour l'amide II, à 1235 cm^{-1} pour l'amide-III, ainsi qu'une série de pics entre 1460 cm^{-1} à 1380 cm^{-1} ont été identifiés comme étant associés aux vibrations de flexion symétriques et asymétriques des groupes méthyle [231].

L'analyse IR-TF des films AP:GE a révélé des pics de transmittance entre 3200 cm^{-1} à 3400 cm^{-1} , correspondant aux vibrations d'étirement des groupes NH et OH, confirmant la formation des interactions hydrogène avec les molécules d' H_2O [232]. Le pic d'étirement du C=O (amide I) à 1637 cm^{-1} et les bandes de flexion N-H (amide II) à 1553 cm^{-1} sont caractéristiques des structures de l'AP et de la GE. Le spectre IR des films AP:GE suggère une interaction physique potentielle entre la GE-NH_3^+ chargée positivement, dérivée de la gélatine, et la pectine- COO^- chargée négativement.

Le pic de vibration d'étirement du C-N à 1553 cm^{-1} est nettement plus intense dans l'échantillon AP:GE@OTA5% que dans le film AP:GE, indiquant la formation de nouvelles liaisons C-N par réaction d'addition de Michael [233]. De même, le déplacement de la vibration d'étirement du groupe carbonyle de 1630 cm^{-1} à 1648 cm^{-1} après réticulation confirme la formation d'une liaison imine ($-\text{C}=\text{N}$) lors des réactions de Schiff [230]. En outre, la présence de vibration d'étirement de $-\text{CH}$ dans les films réticulés est indiquée par les pics à 2940 cm^{-1} à 2960 cm^{-1} [234]. Le pic de transmission enregistré à 1238 cm^{-1} est attribué aux vibrations d'étirement des liaisons C-O. Enfin, une réduction de l'intensité du pic d'étirement de groupes $-\text{OH}$ est observée dans les spectres des films d'hydrogel AP:GE@OTA/Ag par rapport aux films AP:GE@OTA. Cela peut être dû à une augmentation des liaisons hydrogène ou à des interactions intermoléculaires plus fortes entre l'OTA, l'AP et la GE au sein de la structure de l'hydrogel, comme illustré dans la Figure 3.9(b).

3.3.3. Analyse par diffraction des rayons X (DRX) :

Les diffractogrammes de rayons X permettent d'examiner les caractéristiques cristallographiques des échantillons, offrant ainsi des informations sur les phases présentes, l'organisation et la structure des matériaux analysés. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la figure 3.10 :

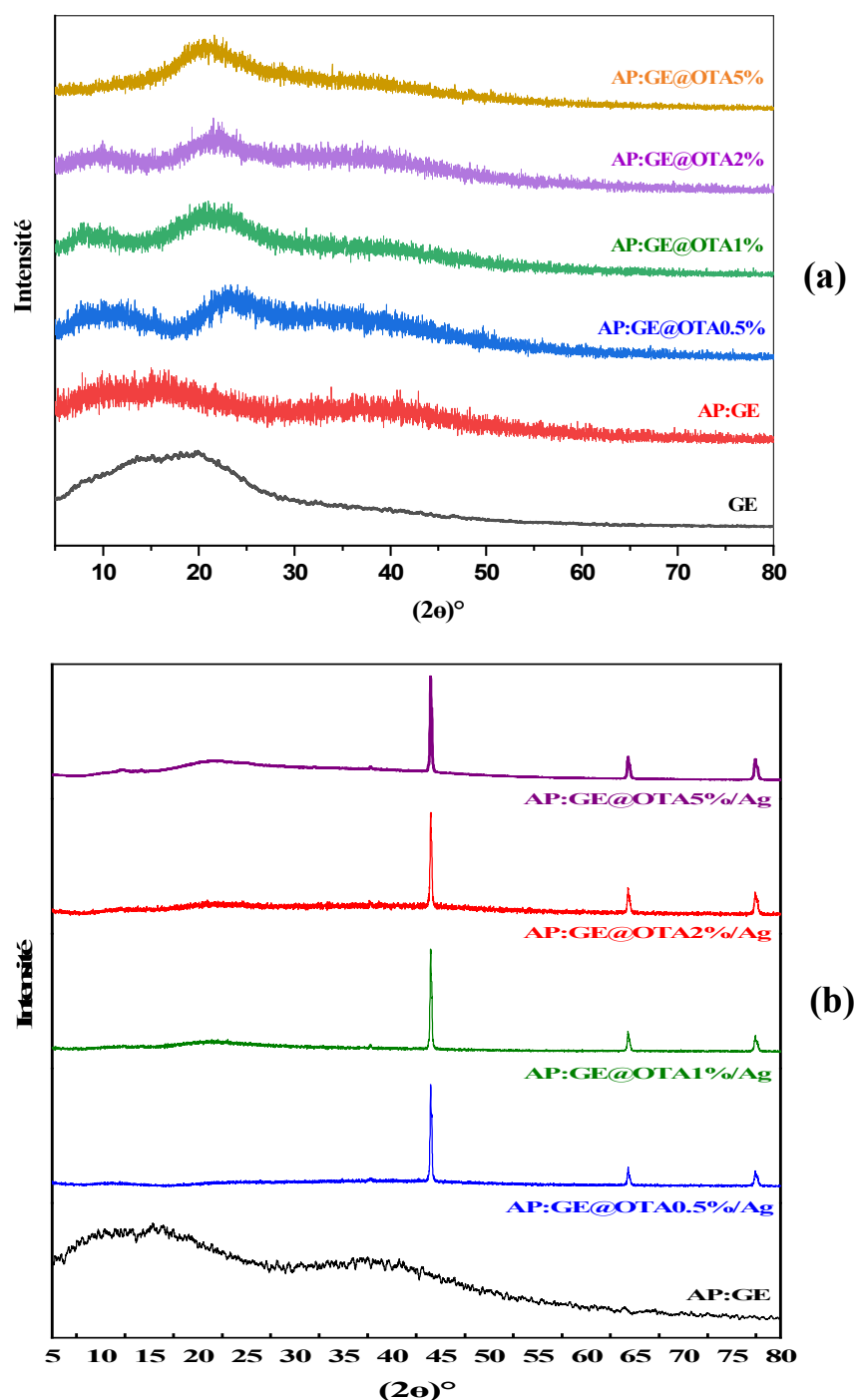


Figure 3.10 : Les diffractogrammes de rayons X des films (a) AP:GE@OTA ;
(b) AP:GE@OTA/Ag.

La Figure 3.10 illustre les diffractogrammes aux rayons X des films AP:GE, AP:GE@OTA, ainsi que de la gélatine pure. La gélatine a exhibé un pic de diffraction unique dans la plage de 2θ de $15\text{--}25^\circ$, caractéristique du profil typique de diffraction de la gélatine pure, attribuable à la structure en α -hélice et en triple hélice, résultant du processus de renaturation du collagène [235]. Les diffractogrammes des échantillons

AP:GE ont révélé des pics larges et diffus à 2θ de 15.91° et 38.19° , témoignant de la nature amorphe du film. L'absence des pics spécifiques au film AP:GE confirme les interactions intermoléculaires entre ces deux biopolymères, comme corroboré par les observations de Mishra et al. [236].

Les diffractogrammes des formulations AP:GE@OTA ont montré des différences par rapport aux films AP:GE. L'augmentation de la fraction massique d'OTA a conduit à une baisse de l'intensité du pic cristallin de la gélatine à 8.10° (2θ), tandis que de nouveaux pics sont apparus à 2θ de 22.95° , 21.48° , 21.35° et à 21.07° pour les formulations AP:GE@OTA0.5%, AP:GE@OTA1%, AP:GE@OTA2% et AP:GE@OTA5%, respectivement. Ces résultats suggèrent une altération de la structure hélicoïdale de la gélatine par les chaînes d'AP au cours du processus de réticulation avec OTA, provoquée par la perturbation des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes, ainsi que par la formation de nouvelles liaisons imines ($-C=N$) résultant de la condensation des groupes amine de la gélatine et de l'AP avec le groupe carbonyle de l'OTA. Ces résultats confirment les conclusions obtenues précédemment par analyse IR-TF. Par ailleurs, le premier pic de diffraction de la gélatine à 8° , souvent associé au diamètre et au taux de la triple hélice [237], est affaibli par l'incorporation de polyols tels que le tanin [238] et le glycérol [238].

D'autre part, les diffractogrammes aux rayons X des échantillons AP:GE@OTA/Ag, présentés dans la Figure 3.10(b), ont révélé quatre pics saillants dans la plage de 30° à 80° . Pour identifier la nature des nanoparticules d'argent formées, une comparaison avec les diffractogrammes des structures cristallines de l'argent pur, répertoriées par le Comité Mixte sur les Normes de Diffraction des Poudres (JCPDS, fichier de référence no. 04-0783), a été réalisée. Les résultats ont confirmé la formation de nanoparticules d'argent avec une structure cubique à faces centrées (fcc) [239], caractérisée par des pics aux angles de 38.72° , 43.96° , 64.29° et 77.40° , correspondant aux plans cristallographiques (111), (200), (220) et (311) de l'argent.

De plus, la taille des nanoparticules d'argent (AgNPs) a été déterminée en utilisant les valeurs de la largeur à mi-hauteur (LMH) associées aux plans de réflexion ainsi que l'équation de Debye-Scherrer, donnant une taille moyenne de particules de 55,62 nm (voir Tableau 3.2, page 84).

3.3.4. Examen morphologique des films par MEB-EDX et MET :

La morphologie et la taille des particules des nanoparticules d'argent (AgNPs) incorporées dans le film AP:GE@OTA5%/Ag ont été analysées à l'aide des images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie électronique en transmission (MET), et sont présentées sur la figure 3.11 :

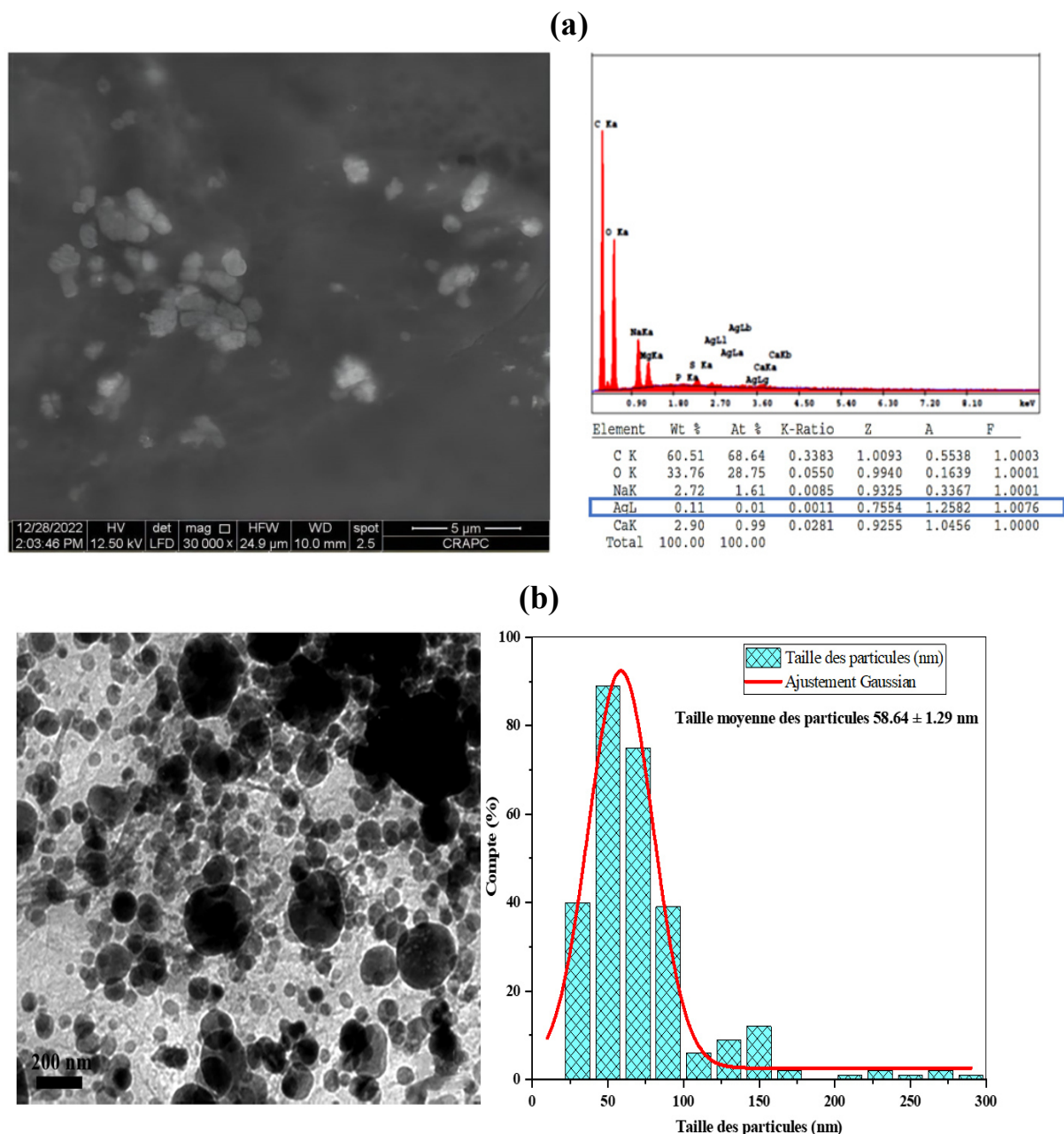


Figure 3.11 : (a) Micrographe MEB et spectre EDX du film AP:GE@OTA5%/Ag ; (b) Micrographie MET et distribution des tailles des AgNPs avec ajustement gaussien dans le film AP:GE@OTA5%/Ag.

L'image MEB obtenue pour le film AP:GE@OTA5%/Ag est présentée sur la Figure 3.11(a). Il est évident que le film présente des surfaces translucides, lisses et homogènes, indiquant que l'ajout d'OTA et d'AgNPs conduit à la formation d'une structure en réseau compact au sein des films AP:GE@OTA5%/Ag. Aucune porosité ni fissure n'a été observée en surface (voir annexe). De plus, la composition du film a été évaluée par spectroscopie à dispersion d'énergie (EDX). Selon les résultats présentés sur la Figure 3.11(a), un pic distinct dans la région correspondant à l'argent a été facilement observé, confirmant l'incorporation des particules d'argent dans le film préparé.

Cependant, l'image MEB révèle clairement que la surface de la matrice est principalement recouverte par des agrégats de nanoparticules à l'échelle submicronique, plutôt que par des nanoparticules individuelles. Ces agrégats semblent être intégrés à la matrice. Ce phénomène s'explique par la forte énergie de surface des AgNPs, qui les pousse à s'agglomérer dans le but de minimiser cette énergie, entraînant ainsi l'agglomération observée [240]. Par conséquent, des formations de particules plus grandes sont observées dans les images MEB, au lieu de nanoparticules individuelles. La Figure 3.11(a) illustre ces agglomérats, qui peuvent apparaître à l'échelle submicronique. Le processus de préparation, incluant le séchage, le revêtement avec un matériau conducteur, et le montage sur un support, peut contribuer à l'agglomération, augmentant ainsi la taille apparente des particules [241]. De plus, la résolution du MEB peut ne pas être suffisante pour distinguer des nanoparticules en dessous d'un certain seuil de taille (moins de 1 μm). De surcroît, la faible conductivité des films d'hydrogel intensifie l'interaction qui se produit entre le faisceau d'électrons et le matériau analysé, provoquant des effets de chauffage ou de charge, qui peuvent entraîner une croissance apparente des particules [242].

Pour fournir des preuves supplémentaires de la nature nanométrique des AgNPs intégrées dans le film préparé, le film hydrogel AP:GE@OTA5%/Ag a été directement placé sur des grilles de cuivre revêtues de carbone pour observation en MET. La Figure 3.11(b) présente une micrographie optique et un histogramme des AgNPs formées dans le réseau hydrogel. Il est évident que les AgNPs formées dans le réseau réticulé présentent une forme quasi-sphérique uniforme et sont bien dispersées, avec des tailles variant principalement entre 30 et 200 nm.

Tableau 3.2. Position angulaire et LMH du pic de diffraction des AgNPs, avec estimation de la taille des nanoparticules à partir des analyses DRX et MET.

2θ [°]	LMH (dθ [°])	Taille de particules à partir de l'analyse DRX (nm)		Taille de particules à partir de l'analyse MET (nm)
37.72	0.18	47.6	55.62	58.64 (Comme valeur moyenne)
43.96	0.130	68.8	(Comme	
64.29	0.163	60.3	valeur	
77.40	0.232	45.8	moyenne)	

La taille moyenne estimée à partir de la micrographie MET (58,64 nm) est en bon accord avec celle déterminée par l'équation de Scherrer, appliquée à la largeur à mi-hauteur (LMH) des pics de diffraction aux rayons X (55,62 nm). Cette corrélation confirme les dimensions nanométriques des AgNPs et la dispersion uniforme des AgNPs dans les films, soulignant l'efficacité du processus de réticulation.

3.3.5. Analyse par microfluorescence X (micro-XRF) :

L'analyse par microfluorescence X a permis de cartographier la répartition des éléments chimiques au sein des échantillons, offrant ainsi une vue détaillée de leur composition élémentaire. Les résultats sont présentés sur le tableau 3.3.

Tableau 3.3. Éléments métalliques contenus dans les films AP:GE@OTA/Ag, déterminés par analyse élémentaire en microfluorescence X (micro-XRF).

Formulations	Element (wt.%)			
	S	Ca	Cu	Ag
AP:GE	74.97	12.21	12.83	00
AP:GE@OTA0.5%/Ag	72.99	24.41	2.55	0.05
AP:GE@OTA1%/Ag	68.85	18.13	12.95	0.07
AP:GE@OTA2%/Ag	56.88	9.96	33.04	0.12
AP:GE@OTA5%/Ag	75.31	24.54	0.01	0.14

Ce tableau présente l'abondance relative des éléments présents dans les films d'hydrogel AP:GE@OTA/Ag, telle que déterminée par l'analyse micro-XRF, au niveau des impuretés. Les résultats ont révélé que le soufre (S), le calcium (Ca) et le cuivre (Cu) sont les principaux éléments constituant des films d'hydrogel AP:GE@OTA/Ag. Une exception est faite pour le film AP:GE@OTA5%/Ag, dans lequel l'abondance relative de

S, Ca et Ag a été mesurée à 75,31%, 24,54% et 0,14%, respectivement. La diminution de la teneur en S et en Ca observée dans les films AP:GE@OTA2%/Ag peut être attribuée à des variations dans l'analyse élémentaire micro-XRF dues à des différences d'épaisseur du film, d'homogénéité et de sensibilité des mesures à des concentrations variables d'OTA [243].

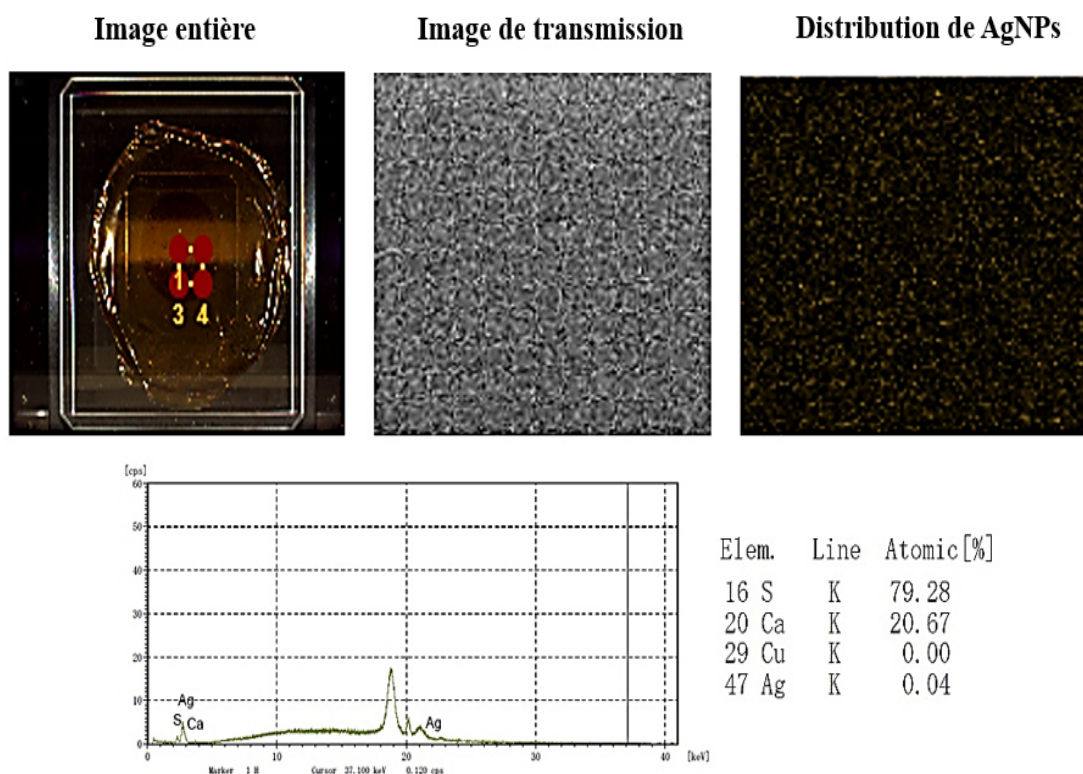


Figure 3.12 : Résultats d'analyse micro-XRF validant l'incorporation et la distribution homogène des AgNPs dans le film AP:GE@OTA5%/Ag.

Les résultats présentés dans cette figure ont confirmé l'incorporation efficace ainsi que la distribution homogène des nanoparticules d'argent (AgNPs) sur les films pour tous les échantillons étudiés. Ces résultats corroborent fortement ceux obtenus avec les analyses MET et DRX.

3.3.6. Analyse mécanique des films d'hydrogel :

Les essais de traction révèlent des données sur la résistance et la flexibilité du film, en mesurant sa capacité de résister à la traction et son allongement jusqu'à rupture. Pour une application en pansement pour plaies, il est suggéré que les films présentent idéalement à la fois une résistance et une flexibilité. Cela est nécessaire pour assurer la durabilité et une résistance suffisante au stress afin de répondre aux exigences

d'application, de manipulation et de stockage. Par conséquent, du glycérol, un composant couramment utilisé dans les formulations d'hydrogel, a été ajouté en tant que plastifiant (40% en poids du poids total du biopolymère sec) à chaque mélange réticulé pour améliorer la flexibilité du film. Le tableau 3.4 résume les propriétés mécaniques obtenues pour l'hydrogel étudié, à savoir l'épaisseur, la résistance à la traction, l'allongement jusqu'à rupture et le module d'élasticité de Young.

Tableau 3.4. Propriétés mécaniques des films d'hydrogel AP:GE@OTA/Ag.

Formulations	Épaisseur (mm)	Résistance à la traction (MPa)	Allongement à la rupture (%)	Module de Young (MPa)
AP:GE	0.25±0.07 ^a	17.22±3.50 ^a	45.86±3.43 ^a	838.69±50.74 ^a
AP:GE@OTA0.5%/Ag	0.27±0.07 ^a	23.11±3.35 ^{a,b}	37.73±1.19 ^b	1218.19±94.56 ^b
AP:GE@OTA1%/Ag	0.34±0.08 ^a	25.33±2.76 ^b	35.43±2.22 ^b	1347.15±46.63 ^c
AP:GE@OTA2%/Ag	0.37±0.08 ^a	30.07±3.49 ^b	33.98±0.96 ^b	1438.30±66.64 ^{c,d}
AP:GE@OTA5%/Ag	0.41±0.07 ^a	38.49±4.00 ^c	32.42±2.94 ^{b,c}	1512.98±67.82 ^d

Remarque : Dans chaque colonne, les moyennes partageant le même exposant indiquent des différences non significatives. En revanche, les moyennes étiquetées avec des lettres distinctes indiquent des différences statistiques (valeur $p < 0,05$).

Le paramètre d'épaisseur a été mesuré à l'aide d'un calibre d'épaisseur. Les résultats ont montré que l'épaisseur variait de 0,27 mm à 0,41 mm. L'incertitude associée à l'épaisseur s'est avérée être inférieure à 0,08 mm. De surcroît, il a été noté que l'épaisseur, la résistance en traction et le module d'élasticité augmentaient proportionnellement à l'incorporation d'OTA et à l'augmentation de sa fraction massique. Néanmoins, l'évolution de l'allongement à la rupture (%) a montré une tendance opposée.

Les résultats présentés dans le Tableau 3.4 ont montré que le film AP:GE@OTA0.5%/Ag présentait un pourcentage d'allongement significativement plus élevé (37,73%) et une résistance à la traction inférieure (23,11 MPa) ainsi qu'un module de Young (1218 MPa) inférieur à ceux des films AP:GE@OTA1%/Ag, AP:GE@OTA2%/Ag et AP:GE@OTA5%/Ag (la valeur p est inférieure à 0,05). Ce résultat suggère que l'ajout de 0,5 % en poids d'OTA était suffisant pour générer un film d'hydrogel AP:GE@OTA/Ag flexible, en améliorant ses propriétés mécaniques. La plus forte fraction massique d'OTA utilisée (5%) confère au film la plus grande robustesse et rigidité. Cela se traduit par une résistance en traction élevée (38,49 MPa) et un module

d'élasticité important (1512,98 MPa), accompagnés d'un faible allongement à la rupture (32,42%). Par contre, les formulations AP:GE@OTA2%/Ag ont présenté une légère diminution de la résistance à la traction (30,07 MPa) et un faible module de Young (1438,30 MPa), ainsi qu'une augmentation du pourcentage d'allongement (33,98%), par rapport aux films AP:GE@OTA5%/Ag.

Les variations des propriétés mécaniques des films AP:GE@OTA/Ag en fonction de la concentration d'OTA s'expliquent par son influence sur la densité et la réticulation du réseau polymère. Avec une faible concentration d'OTA (0,5 %), le réseau polymère reste peu dense, ce qui améliore la flexibilité du film mais réduit sa rigidité. En revanche, une forte concentration d'OTA (5 %) génère un réseau plus dense et rigide, conduisant à une résistance à la traction et un module de Young élevés, mais un allongement réduit en raison de la rigidité accrue. Une concentration intermédiaire (2 %) crée un équilibre entre flexibilité et rigidité, reflétant une réticulation modérée et une organisation moins homogène. Ces résultats reflètent l'équilibre entre flexibilité et rigidité, modulé par la concentration d'OTA et la formation de liaisons covalentes et non covalentes dans le film.

Pour fournir des informations plus détaillées, nous présentons l'évolution de la résistance à la traction et de l'allongement à la rupture des films réticulés avec différentes fractions massiques d'OTA.

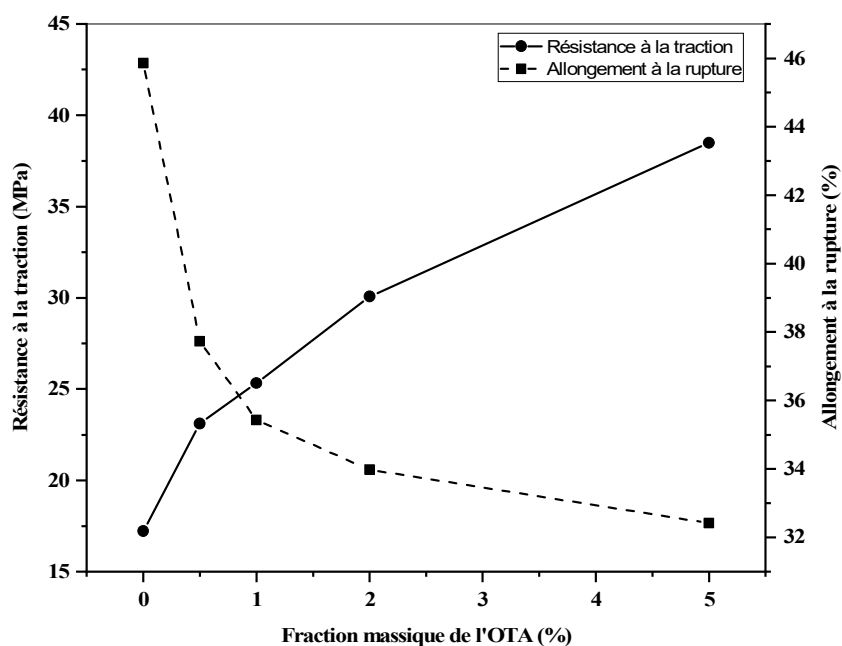


Figure 3.13 : Impact de la concentration en OTA sur les propriétés de traction et l'élongation à la rupture des films AP:GE@OTA/Ag.

Au regard de la Figure 3.13, il est évident qu'à mesure que la fraction massique de l'agent de réticulation augmente, la résistance en traction s'accroît de manière significative, tandis que l'allongement à la rupture diminue, en comparaison avec le film AP:GE. Cela est principalement dû à la capacité de l'OTA à augmenter les forces intermoléculaires le long des chaînes polymères [244]. D'autre part, à mesure que la concentration d'OTA augmentait, les films traités conservaient leur transparence mais prenaient une teinte jaune miel à l'œil nu, en raison de la couleur naturellement jaune miel de la solution d'OTA. En résumé, il est possible de déduire que l'OTA et les AgNPs induisent un effet de réticulation, contribuant ainsi à l'amélioration des propriétés mécaniques des films AP:GE.

3.3.7. Analyse thermique des films d'hydrogel :

L'étude du comportement thermique des films AP:GE@OTA/Ag a été réalisée par le biais d'une analyse thermogravimétrique sous atmosphère d'azote. Les courbes TG sont présentées dans la Figure 3.14 :

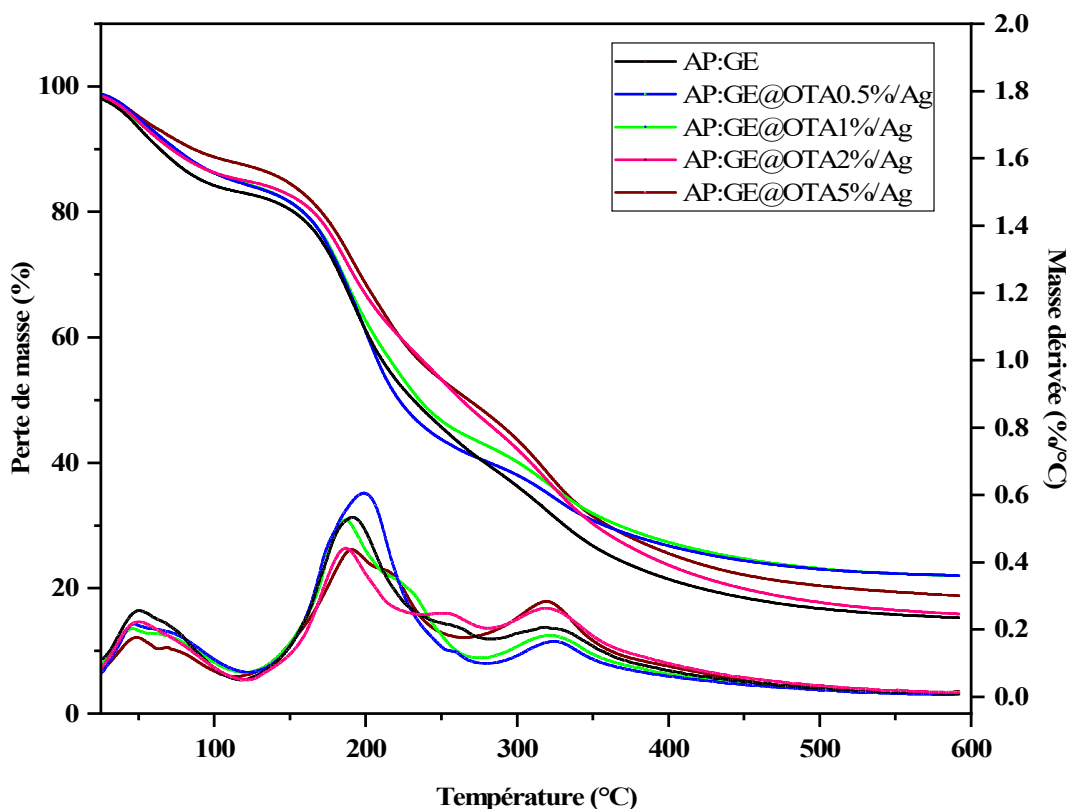
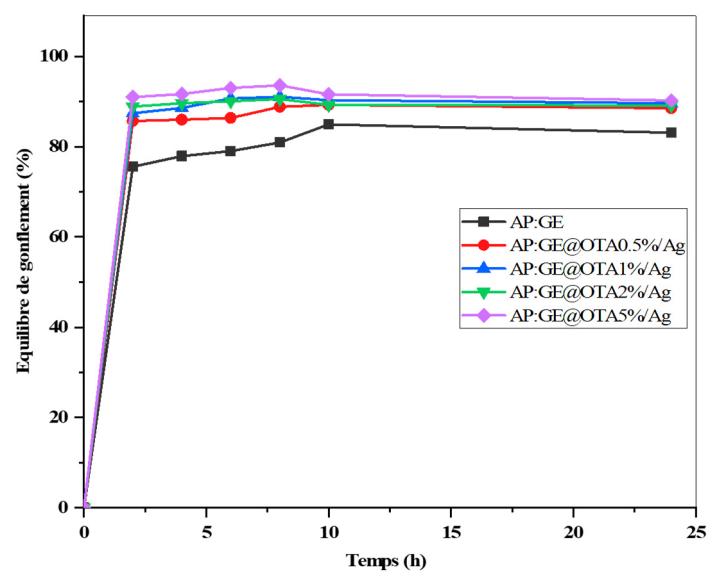


Figure 3.14 : Les thermogrammes TG et DTG des films AP:GE et AP:GE@OTA/Ag chauffés à une cadence de 10°C/minute sous une atmosphère azotée.

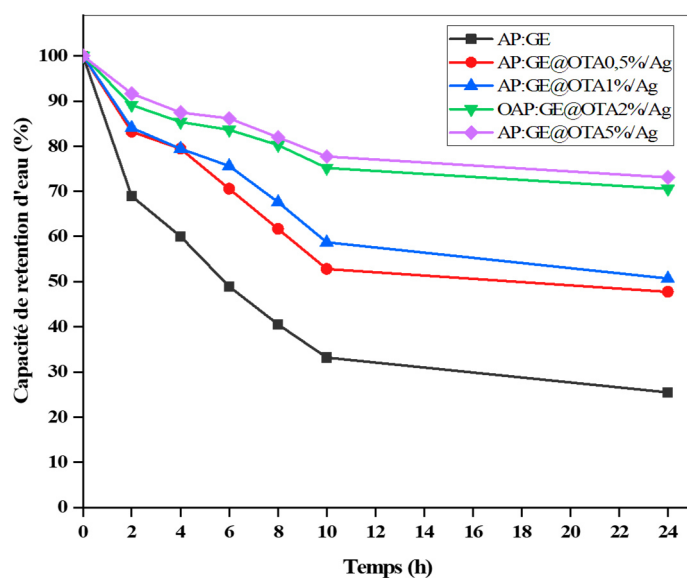
La dégradation thermique des films hydrogels s'est produite en trois étapes de décomposition. De plus, le taux de perte de masse au cours de ces étapes pour les échantillons AP:GE@OTA/Ag était inférieur à celui du film AP:GE. La première étape de décomposition, survenant entre 50 et 100 °C, est due à l'évaporation de l'eau absorbée. La seconde étape, observée entre 190 et 230 °C, a entraîné une perte de masse d'environ 30 % pour les échantillons AP:GE@OTA/Ag, probablement due à l'oxydation thermique des films [236]. À mesure que la fraction massique d'OTA augmentait dans le film, les poids résiduels étaient plus élevés que ceux du film AP:GE, qui étaient d'environ 30 % en poids. Cela suggère que l'inclusion à la fois d'OTA et de nanoparticules d'argent (AgNPs) dans le réseau hydrogel AP:GE améliore la stabilité thermique du mélange. Cette amélioration est due aux interactions fortes formées entre les groupes carbonyles de l'OTA et les groupes amines de l'AP et du GE par une réaction de base de Schiff, créant un nouveau groupe fonctionnel (imine). La dernière perte de masse, survenant entre 300 et 320 °C, était due à la décomposition thermique finale des films. Le résidu non volatil restant à 320 °C représentait environ 20 % de la masse initiale du film.

3.3.8. Résultats de l'évaluation de la capacité d'absorption de fluide, capacité de rétention d'eau et du taux de transmission de vapeur d'eau des films d'hydrogel :

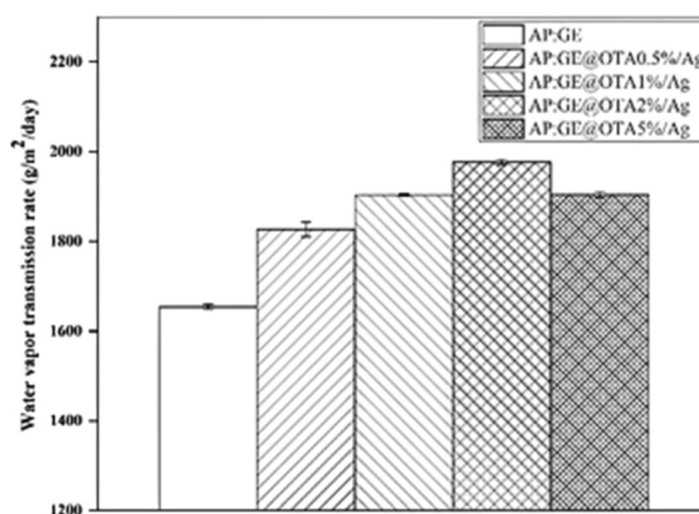
L'identification de matériaux adéquats pour les pansements nécessite une évaluation précise de divers facteurs, notamment la capacité d'absorption des fluides, la rétention d'humidité et le taux de transmission de vapeur d'eau (WVTR) [245]. Ces éléments sont cruciaux pour garantir l'efficacité d'un pansement et favoriser la cicatrisation tout en maintenant un environnement optimal pour la guérison de la plaie. L'aptitude à absorber les fluides permet de maintenir la plaie propre et sèche, alors que la capacité de rétention d'humidité assure une hydratation adéquate du tissu cutané. De plus, le taux de transmission de la vapeur d'eau influe sur la perméabilité à l'humidité, favorisant ainsi la respiration de la peau tout en évitant l'accumulation de liquide, ce qui réduit les risques d'infection et favorise une cicatrisation rapide et efficace. Les résultats sont présentés ci-après :



(a)



(b)



(c)

Figure 3.15 : Capacité d'absorption des fluides (a), capacité de rétention d'eau (b), et taux de transmission de vapeur d'eau (c) des formulations AP:GE@OTA/Ag.

Les capacités d'absorption des fluides des films hydrogels AP:GE@OTA/Ag ont été évaluées en les incubant dans du PBS à 37°C. Les résultats, illustrés dans le graphique (a) de la Figure 3.15, montrent que tous les films hydrogels, à l'exception de l'échantillon AP:GE, ont suivi des schémas similaires, atteignant un état d'équilibre d'absorption des fluides après environ 2 heures (environ 90 %). Les films AP:GE et AP:GE@OTA0.5%/Ag ont montré des capacités d'absorption de fluides inférieures par rapport aux autres formulations, probablement en raison de réseau polymère moins dense et de leur degré de réticulation plus faible. Cela limite la formation des pores et affecte la capacité du réseau à retenir les fluides [246]. Aucune différence significative n'a été constatée entre 2 et 8 heures pour les films contenant OTA et du glycérol (agissant comme humectant), permettant à ces films d'atteindre rapidement la saturation en absorption des fluides en 2 heures.

L'évaluation des capacités de rétention d'eau ont été réalisées en mesurant la perte d'eau lorsqu'ils étaient exposés à des conditions d'air sec. Les données, illustrées dans le graphique (b) de la Figure 3.15, ont révélé que l'incorporation d'OTA et de nanoparticules d'argent (AgNPs) a entraîné une augmentation de la capacité de rétention d'eau des films. Par ailleurs, il a été constaté que ces capacités dépendent de la fraction massique de l'agent réticulant utilisé lors de la préparation. Le film AP:GE@OTA5%/Ag a montré la plus haute capacité de rétention d'eau, attribuée à une rigidité accrue et une flexibilité réduite des chaînes macromoléculaires AP:GE@OTA/Ag. L'évaluation de la rétention d'eau sur 24 heures a révélé une augmentation significative lorsque la teneur en OTA dépassait 1 %. Au-delà de ce point, le changement de capacité restait relativement faible (2 %-5 %). En effet, les films hydrogels avec une structure rigide tendent à absorber moins de fluides mais montrent une capacité supérieure de rétention d'eau.

Le taux de transmission de vapeur d'eau (WVTR) revêt une importance capitale dans la régulation de l'humidité dans les zones de plaie. En général, un taux de 2000-2500 g/m²/jour est optimal pour maintenir l'humidité sans provoquer de déshydratation [247]. Des valeurs inférieures peuvent entraîner une accumulation d'exsudat de plaie, tandis que des WVTR plus élevés peuvent entraîner une déshydratation de la surface de la plaie. Les histogrammes du graphique (c) de la Figure 3.15 montrent des valeurs de WVTR allant de 1653 à 1896 g/m²/jour, correspondant de près à la plage optimale. L'augmentation de la teneur en OTA dans le film jusqu'à 2 % a entraîné des valeurs de WVTR plus élevées, probablement en raison des sites de liaison hydrophiles de l'OTA qui favorisent

l'absorption de l'humidité. L'incorporation des AgNPs a perturbé la compacité de la matrice polymère en créant des micro-vides et des canaux, augmentant ainsi le volume libre et fournissant des voies supplémentaires pour la vapeur d'eau [248]. De plus, le glycérol, agissant comme humectant et plastifiant, interagit avec les chaînes polymériques pour réduire les forces intermoléculaires et améliorer la mobilité des chaînes. À une concentration de 40 %, la nature hydrophile du glycérol a conduit à une absorption accrue d'eau, améliorant ainsi la flexibilité et la perméabilité du réseau polymérique à la vapeur d'eau. Cela a entraîné une matrice de film moins dense, facilitant une plus grande transmission de vapeur d'eau à travers le matériau [249]. Par ailleurs, l'augmentation des sites hydrophiles et des interactions fortes dans le réseau polymérique due à l'introduction de l'OTA, notamment les liaisons d'hydrogène et les liaisons de coordination impliquant l'OTA et les AgNPs, favorise la rétention d'humidité et la transmission de celle-ci. Les molécules d'eau interagissent plus facilement avec le réseau, ce qui améliore le WVTR [250].

Au-delà d'une teneur en OTA de 2 %, la tendance s'est inversée, indiquant que l'OTA avait une influence plus importante sur la matrice du film que l'ajout de plastifiant. Selon les travaux de Ou et al. [251], la réticulation restreint le mouvement des molécules en formant une structure plus serrée, réduisant ainsi la perméabilité à la vapeur d'eau.

3.4. Etude *in vitro* de la cinétique de libération d'argent à partir des films d'hydrogel :

La cytotoxicité des nanoparticules d'argent pose depuis longtemps des défis significatifs dans les applications biomédicales, ce qui a incité à des recherches approfondies sur leurs mécanismes toxicologiques. Malgré des efforts considérables, les mécanismes précis et les interactions avec les entités biologiques ne sont pas encore totalement élucidés [252, 253]. La cytotoxicité des AgNPs est principalement due à la libération d'ions Ag^+ , qui interagissent avec les composants cellulaires, affectant l'ADN et entraînant la lyse cellulaire [254]. Des études ont montré que les AgNPs de petite taille libèrent des concentrations plus élevées d'ions Ag^+ par rapport aux particules plus grandes, suggérant une cytotoxicité dépendant de la taille [255].

Dans ce contexte, il est jugé nécessaire d'étudier la libération d'argent des pansements AP:GE@OTA/Ag dans des conditions physiologiques simulées. La teneur initiale en argent a été mesurée par digestion acide suivie d'analyses SAAFG, et les résultats sont exposés dans le tableau suivant :

Tableau 3.5. Chargement initial en argent dans les formulations AP:GE@OTA/Ag.

Formulations	Teneur en argent ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Pourcentage de teneur en argent (% w/w)
AP:GE@OTA0.5%/Ag	1.02 ± 0.13	0.005
AP:GE@OTA1%/Ag	1.94 ± 0.15	0.009
AP:GE@OTA2%/Ag	2.63 ± 0.37	0.013
AP:GE@OTA5%/Ag	3.11 ± 0.76	0.015

Les formulations AP:GE@OTA/Ag ont montré une charge moyenne d'argent variant entre $1,02 \pm 0,13$ et $3,11 \pm 0,76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. L'augmentation observée de la teneur en argent avec des concentrations plus élevées d'OTA dans les films hydrogels AP:GE@OTA/Ag est attribuée aux effets de chélation et de coordination de l'OTA [32], qui améliorent l'incorporation des ions argent, ainsi qu'à une stabilité accrue et à des changements structuraux dans la matrice hydrogel, facilitant une meilleure rétention et distribution des AgNPs.

Les cinétiques de libération cumulatives d'argent sont illustrées dans la figure suivante :

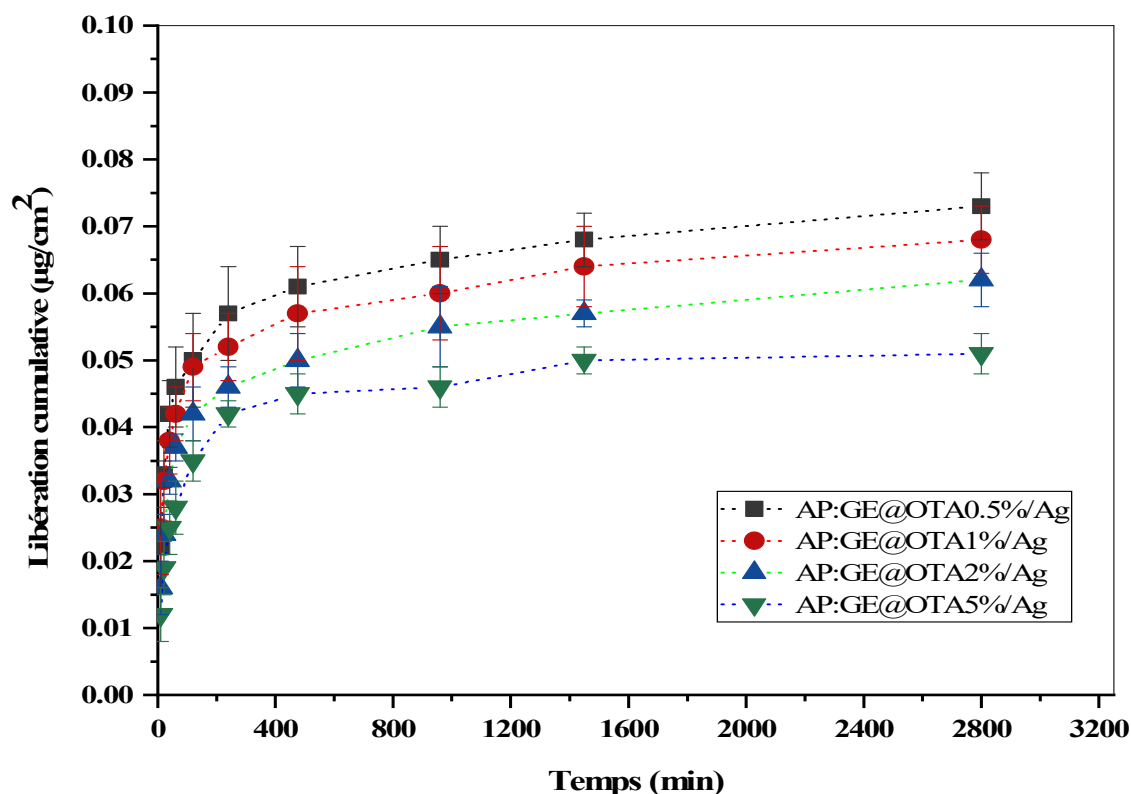


Figure 3.16 : Profils de libération d'argent à partir des films élaborés dans un milieu FCS à 37°C , avec un pH de 7,4.

A la lumière des résultats de la cinétique de libération d'argent à partir des films élaborés, les profils de libération ont révélé un schéma biphasique pour tous les pansements AP:GE@OTA/Ag, caractérisé par une libération initiale rapide suivie d'une libération soutenue. La libération initiale linéaire rapide s'est produite au cours des 2 premières heures, suivie d'une libération prolongée attribuée à la libération progressive des ions Ag^+ provenant des pansements. Après 48 heures, les pourcentages de libération cumulative d'argent des pansements AP:GE@OTA0.5%/Ag, AP:GE@OTA1%/Ag, AP:GE@OTA2%/Ag et AP:GE@OTA5%/Ag étaient respectivement de 7.18%, 3.5%, 2.37% et 1.66%. Ces résultats suggèrent que les pansements AP:GE@OTA/Ag contrôlent efficacement l'infection bactérienne dès les premières phases de la blessure, offrant une activité antibactérienne soutenue sur une période prolongée.

Des recherches antérieures ont examiné la libération d'argent à partir de différents pansements commerciaux, notamment AQUACEL™ Ag, ACTISORB™ Silver 220, ACTICOAT™ Flex 3, et Mepilex™ Ag. Dans un substitut de sérum, la libération d'argent variait de 7 % à 67 %, avec des taux allant de 0,0001 $\mu\text{g}/(\text{h cm}^2)$ à 4099 $\mu\text{g}/(\text{h cm}^2)$ [256]. Une autre étude a observé une libération d'environ 86 % d' Ag^+ après 48 heures à partir d'un nanocomposite de cellulose bactérienne chargé d'argent immergé dans de l'eau distillée [257]. En revanche, les pansements AP:GE@OTA/Ag, contenant seulement 1,02 à 3,11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ d'argent, libèrent seulement 1,63 à 7,15 % d'argent après 48 heures. Les faibles concentrations d'ions Ag^+ indiquent une cytotoxicité réduite, probablement due à l'encapsulation des AgNPs dans un réseau polymérique tridimensionnel [258].

Dans le but de clarifier les mécanismes régissant la libération de l'argent à partir des formulations réalisées, les résultats quantitatifs de libération de l'argent *in vitro* obtenus dans des conditions physiologiques simulées (fluide corporel simulé, pH 7,4) ont été ajustées en utilisant les modèles mathématiques de premier ordre, de Korsmeyer-Peppas et de Peppas-Sahlin (voir annexe). Les coefficients de corrélation R^2 obtenus pour l'ensemble des modèles, et les constantes et les exposants caractéristiques des trois modèles sont rassemblés dans le tableau suivant :

Tableau 3.6. Paramètres cinétiques obtenus par ajustement à plusieurs modèles cinétiques mathématiques du profil de libération de l'argent dans le FCS à 37°C, pH 7,4.

Formulations	Modèle premier ordre			Modèle Sahlin-Peppas				Modèle Korsmeyer-Peppas		
	$M_t / M_\infty = a[1-\exp(-bt)]$			$M_t / M_\infty = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$				$M_t / M_\infty = K_m t^n$		
	a	B	Adj.R ²	K ₁	K ₂	m	Adj.R ²	K _m	n	Adj.R ²
AP:GE@OTA0.5%	6.16 ± 0.29	0.02 ± 0.00	0.80	1.71 ± 0.22	-0.10 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.95	2.22 ± 0.23	0.15 ± 0.01	0.91
AP:GE@OTA1%	3.00 ± 0.15	0.03 0 ± 0.00	0.75	0.92 ± 0.08	-0.06 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.97	1.14 ± 0.09	0.14 ± 0.01	0.94
AP:GE@OTA2%	2.01 ± 0.09	0.02 ± 0.00	0.84	0.46 ± 0.06	-0.02 ± 0.00	0.29 ± 0.03	0.96	0.62 9 ± 0.07	0.17 ± 0.01	0.92
AP:GE@OTA5%	1.48 ± 0.06	0.01 ± 0.00	0.89	0.27 ± 0.04	-0.01 ± 0.00	0.33 ± 0.02	0.96	0.42 ± 0.06	0.18 ± 0.02	0.88

En analysant les résultats, il a été constaté que le modèle de Peppas-Sahlin s'est avéré être le plus approprié (Tableau 3.6), prenant en considération à la fois les mécanismes de diffusion et de gonflement. Les résultats ont révélé une prédominance de la diffusion ($m \approx 0,5$) et un gonflement minimal ($K_2 \rightarrow 0$), suggérant un mécanisme de libération d'argent basé sur la diffusion. Dans l'ensemble, ces résultats soulignent l'importance de la densité de réticulation des films AP:GE@OTA/Ag dans la régulation efficace de la libération d'argent, ce qui les rend particulièrement adaptés pour être utilisés comme pansements à libération prolongée dotés de propriétés antibactériennes.

3.5. Résultats de l'évaluation de la cytocompatibilité des films d'hydrogel avec le test XTT :

L'évaluation de la cytocompatibilité constitue un pilier fondamental dans le développement de biomatériaux pour des applications avancées. Les effets cytotoxiques des pansements formulés ont été testés sur la lignée cellulaire NIT-1 à diverses concentrations pendant 72 heures, à l'aide du test XTT. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :

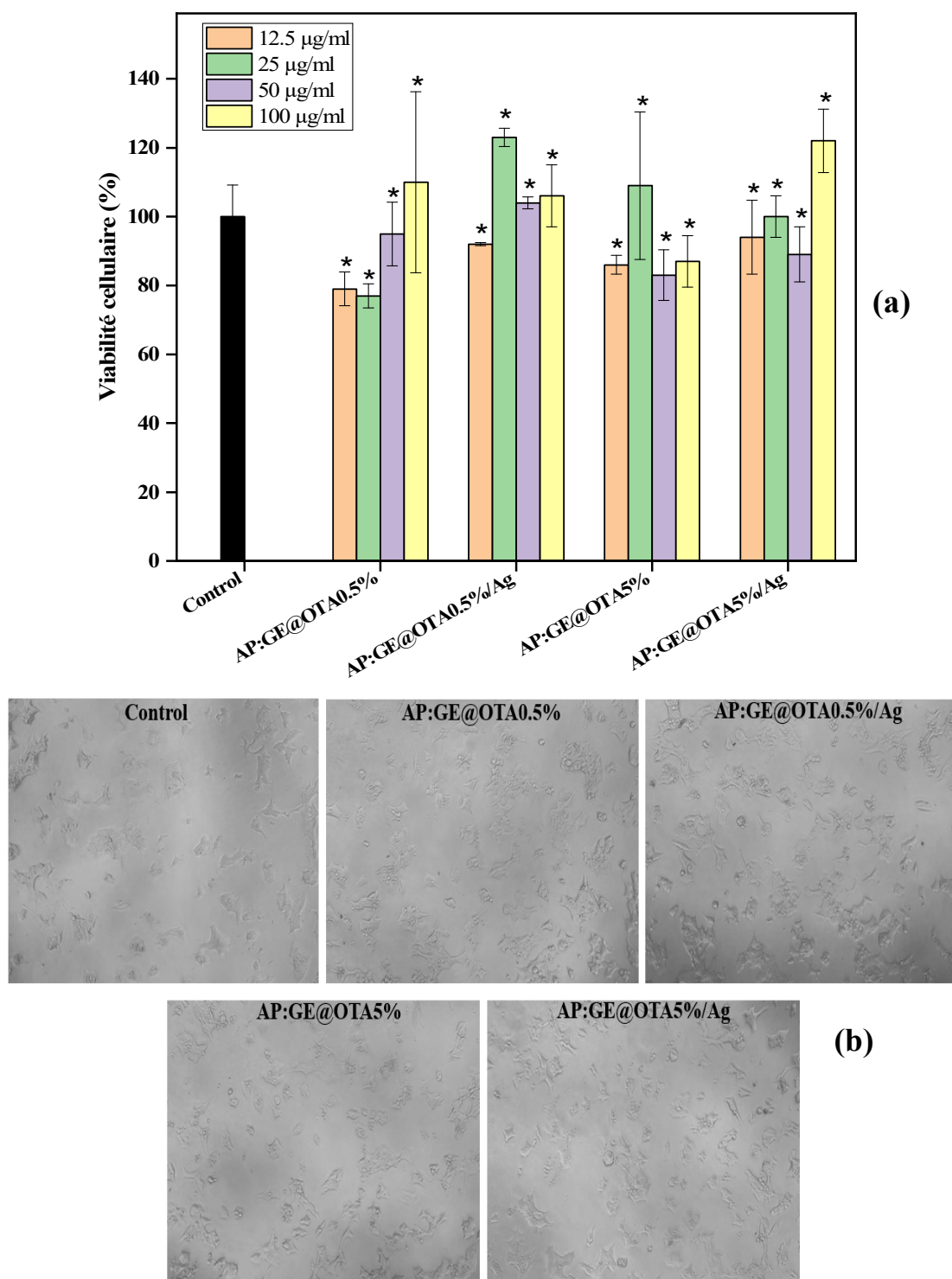


Figure 3.17 : (a) Evaluation de la viabilité cellulaire *in vitro* par le test XTT sur des cellules d'insulinome de souris NIT-1 après 72 h ; et (b) Morphologie cellulaire des cellules NIT-1 après 72 h de traitement avec des films élaborés à 100 $\mu\text{g/ml}$. Les images ont été capturées à l'aide d'un microscope à contraste de phase Nikon Eclipse Ts2 (grossissement 20X).

La Figure 3.17(a) montre que les pansements AP:GE@OTA0,5% et AP:GE@OTA5% affichent une viabilité cellulaire favorable, les variations de concentration d'OTA n'influent pas sur la croissance cellulaire. Il est bien établi que PE, GE et TA sont des substances bioactives biocompatibles, capables de stimuler efficacement la prolifération cellulaire [259]. Même avec les pansements AP:GE@OTA0,5%/Ag et AP:GE@OTA5%/Ag, aucune cytotoxicité n'a été observée sur les cellules NIT-1. Fait marquant, le pansement AP:GE@OTA0,5%/Ag a montré la viabilité cellulaire la plus élevée parmi les pansements testés. L'analyse statistique a révélé des différences significatives par rapport aux cellules témoins. Dans cette étude, les AgNPs ont été synthétisés *in situ* sur les films par le biais de la réduction effectuée par l'OTA, ce qui a permis d'améliorer considérablement leur dispersion et de réduire leur cytotoxicité.

L'examen microscopique des cellules vivantes a été effectué en utilisant un microscope à contraste de phase (Figure 3.17(b)). Toutes les matrices polymériques testées ont offert une surface propice à l'adhésion et à la croissance des cellules. Par conséquent, les pansements AP:GE@OTA et AP:GE@OTA/Ag sont innocuels et favorisent la prolifération cellulaire, ce qui les rend prometteurs pour des applications en cicatrisation des plaies. Nos résultats corroborent ceux de la littérature, où l'incorporation de TA et AgNPs dans une matrice polymérique de chitosane a montré une cytocompatibilité améliorée [233]. Cette étude a souligné la supériorité du cryogel CS-Ag-TA, en raison de la présence conjointe d'AgNPs et de TA, stimulant la prolifération et la viabilité cellulaire.

3.6. Activité antibactérienne des films d'hydrogel :

L'efficacité antibactérienne représente une exigence capitale pour les pansements destinés à la cicatrisation des plaies. L'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure des zones d'inhibition induites par les pansements élaborés contre *E. coli* et *S. aureus*, deux pathogènes fréquemment présents dans les plaies infectées. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :

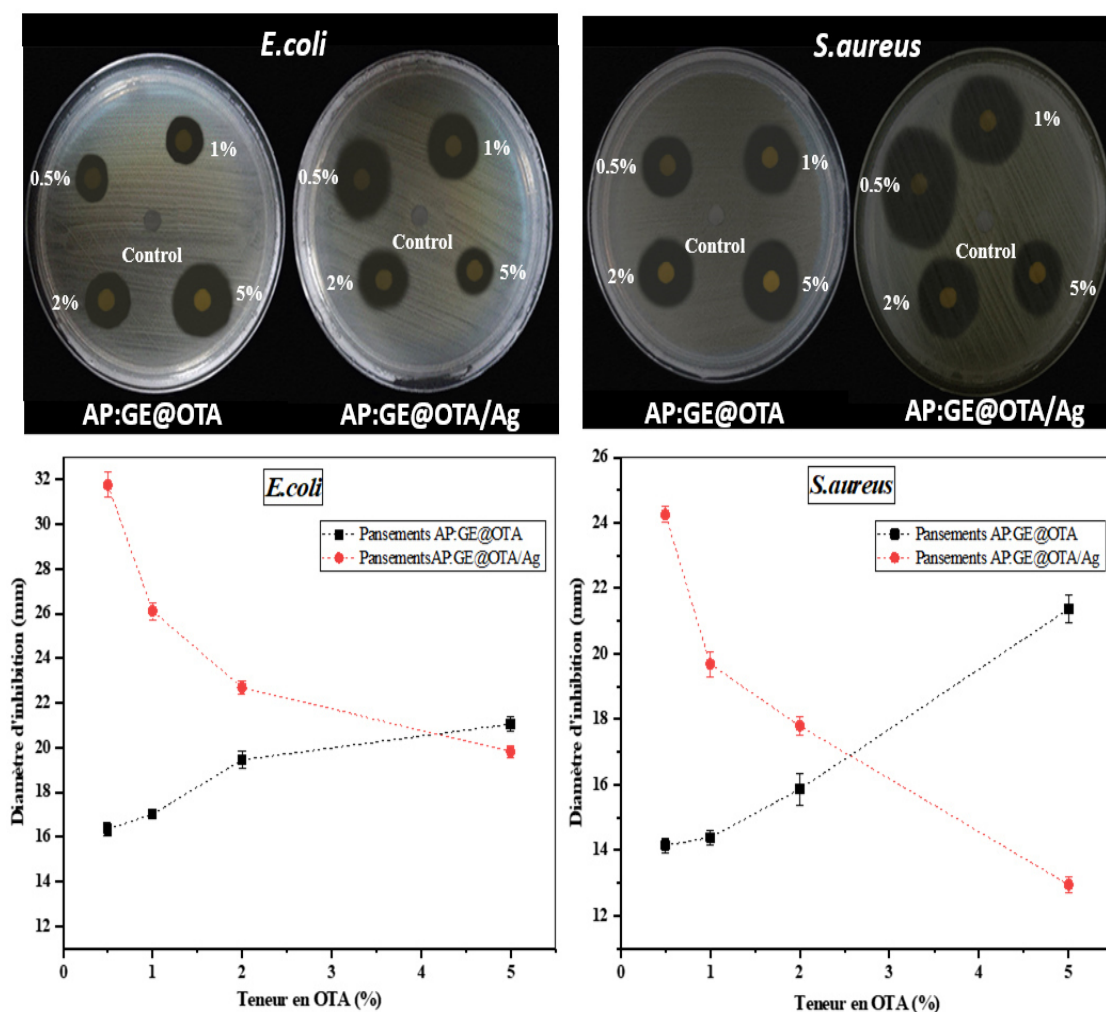


Figure 3.18 : Évaluation de l'activité antimicrobienne, par mesure de la zone d'inhibition, induite par les films élaborés contre *E.coli* et *S.aureus*.

Comme illustré dans la Figure 3.18, ces deux formulations ont éliminé efficacement les colonies bactériennes environnantes, tandis que le groupe AP:GE n'a montré aucun effet bactériostatique discernable.

À mesure que la concentration d'OTA augmentait, la zone antibactérienne des panements AP:GE@OTA s'est élargie de manière progressive. Des recherches antérieures ont démontré que TA exerce un effet inhibiteur remarquable sur l'expansion des bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif, avec une activité bactériostatique plutôt que bactéricide [260]. Cette activité est due à richesse en groupes hydroxyles phénoliques, connus pour neutraliser efficacement les radicaux libres et protéger contre les micro-organismes [261]. Le groupe AP:GE@OTA/Ag a montré des zones d'inhibition significativement plus larges, avec des valeurs comprises entre $12,94 \pm 0,23$ à $31,77 \pm 0,57$ mm (Figure 3.18). Cette activité antimicrobienne accrue est attribuée à l'effet

synergique de l'OTA et des AgNPs. Fait intéressant, une relation inverse a été observée entre la teneur en OTA et la zone antibactérienne des pansements AP:GE@OTA/Ag contre *S. aureus* et *E. coli*. En particulier, le pansement AP:GE@OTA0,5 %/Ag a montré les zones bactériostatiques les plus marquées, mesurant environ $24,25 \pm 0,24$ mm pour *E. coli* et $31,77 \pm 0,57$ mm pour *S. aureus*. Ce phénomène est lié à une modification de la densité de réticulation due à la coordination des métaux lors du chargement en argent. Ces résultats concordent avec ceux des études *in vitro* sur la libération d'argent. La zone d'inhibition est induite par la diffusion des ions argent, piégés dans la matrice AP:GE@OTA/Ag, dans le milieu environnant. Ce processus de diffusion, facilité par les pores de la matrice gonflée, convertit l'argent métallique (Ag^0) en ions argentiques (Ag^+) en présence d'humidité. Ces ions interagissent efficacement avec les groupes thiol des enzymes bactériennes responsables de la respiration cellulaire, entraînant la destruction des cellules bactériennes [262]. Alternativement, les ions Ag^+ peuvent interagir avec la paroi cellulaire des bactéries, qui est chargée négativement, provoquant la désintégration de la membrane ou perturbant le processus de réplication de l'ADN, inhibant ainsi la croissance bactérienne. Si les AgNPs sont suffisamment petites, elles peuvent pénétrer la paroi cellulaire bactérienne, entraînant la fuite des constituants intracellulaires et la mort cellulaire [263]. Ces résultats soulignent l'activité antibactérienne significative des pansements AP:GE@OTA0,5%/Ag contre les deux types de bactéries, ce qui les rend particulièrement prometteurs en tant que candidats pour des essais *in vivo* sur la cicatrisation des plaies. Ce pouvoir antibactérien résultant d'un mécanisme synergique impliquant plusieurs interactions biochimiques. Ce mécanisme repose principalement sur trois modes d'action complémentaires :

- Altération et perméabilisation de la membrane bactérienne :

L'un des premiers effets antibactériens du biopolymère AP:GE@OTA/Ag repose sur l'action des nanoparticules d'argent (AgNPs) et des polyphénols oxydés dérivés de l'OTA, qui interagissent directement avec la paroi cellulaire et la membrane plasmique des bactéries. Les AgNPs ont une affinité pour les groupes thiol (-SH) et les protéines membranaires, entraînant une perturbation de la structure lipidique et une altération de la perméabilité membranaire. Cette interaction entraîne une fuite des ions et des macromolécules intracellulaires essentielles, comme les nucléotides et les ions K^+ , induisant ainsi un stress osmotique irréversible. Les polyphénols oxydés issus de l'OTA interagissent avec les phospholipides membranaires et forment des liaisons hydrogène

avec les protéines de surface bactériennes, perturbant leur fonction et augmentant la fluidité membranaire.

- Induction du stress oxydatif et génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Une fois les AgNPs internalisées ou en contact avec la membrane bactérienne, elles catalysent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$). Ces ROS provoquent des dommages oxydatifs aux lipides membranaires, entraînant une peroxydation lipidique qui fragilise la membrane bactérienne. Elles induisent également des modifications structurelles dans les protéines intracellulaires, en oxydant les groupes thiol des enzymes bactériennes, inhibant ainsi leurs fonctions catalytiques essentielles. L'ADN bactérien est également une cible des ROS, entraînant des cassures oxydatives des brins d'ADN et bloquant ainsi la réplication cellulaire. L'OTA, en tant que polyphénol oxydé, joue également un rôle dans l'amplification du stress oxydatif, en chélatant les ions métalliques nécessaires à la neutralisation des ROS et en perturbant le métabolisme redox bactérien.

- Inhibition des processus métaboliques et de la division cellulaire :

Enfin, l'association AgNPs-OTA interfère avec plusieurs cibles métaboliques intracellulaires : Les nanoparticules d'argent interagissent avec les ribosomes bactériens, inhibant la synthèse protéique en perturbant la lecture de l'ARNm et en induisant des erreurs de traduction. La présence des polyphénols oxydés issus de l'OTA perturbe la voie des pentoses phosphates, réduisant ainsi la production de NADPH, une molécule clé pour la régénération du glutathion et la neutralisation du stress oxydatif. L'effet combiné de l'accumulation des ROS et de l'altération des protéines enzymatiques bloque la réplication de l'ADN et déclenche des mécanismes de mort cellulaire programmée chez certaines bactéries.

3.7. Hémocompatibilité des films d'hydrogel :

L'hémocompatibilité est un critère essentiel pour évaluer l'aptitude des biomatériaux, en particulier lorsque ces derniers sont destinés à entrer en contact direct avec le sang *in vivo* [219]. Selon les normes, les biomatériaux sont classés en fonction de leur potentiel hémolytique : non hémolytique (0-2 % d'hémolyse), légèrement hémolytique (2-5 % d'hémolyse) et hémolytique (>5 % d'hémolyse) [264]. Les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 3.7. Test hémolytique des globules rouges humains (HRBCs) après traitement avec de l'eau distillée, une solution PBS, des films élaborés pendant 2 heures.

Formulations	PH (%)
AP:GE	1.39 ± 0.03
AP:GE@OTA0.5%	1.21 ± 0.05
AP:GE@OTA5%	1.52 ± 0.06
AP:GE@OTA0.5%/Ag	1.60 ± 0.06
AP:GE@OTA5%/Ag	1.70 ± 0.12

Comme le montre le Tableau 3.7, le potentiel hémolytique des groupes expérimentaux, testés à 37 °C pendant 2 heures, reste constamment inférieur à 2 %. Cela indique une perturbation minimale des membranes des cellules sanguines, confirmant l'aptitude des échantillons pour des applications *in vitro* [265]. Aucune différence significative d'hémolyse n'a été constatée parmi les pansements élaborés, et le faible taux d'hémolyse affiché par ces derniers suggère une biocompatibilité accrue. Il est donc important de noter que l'incorporation de l'OTA et des AgNPs n'induit pas d'hémolyse, indiquant ainsi une excellente hémocompatibilité.

Les performances hémostatiques des pansements ont également été évaluées à l'aide d'un indice relatif, le BCI. Les résultats sont présentés ci-dessous :

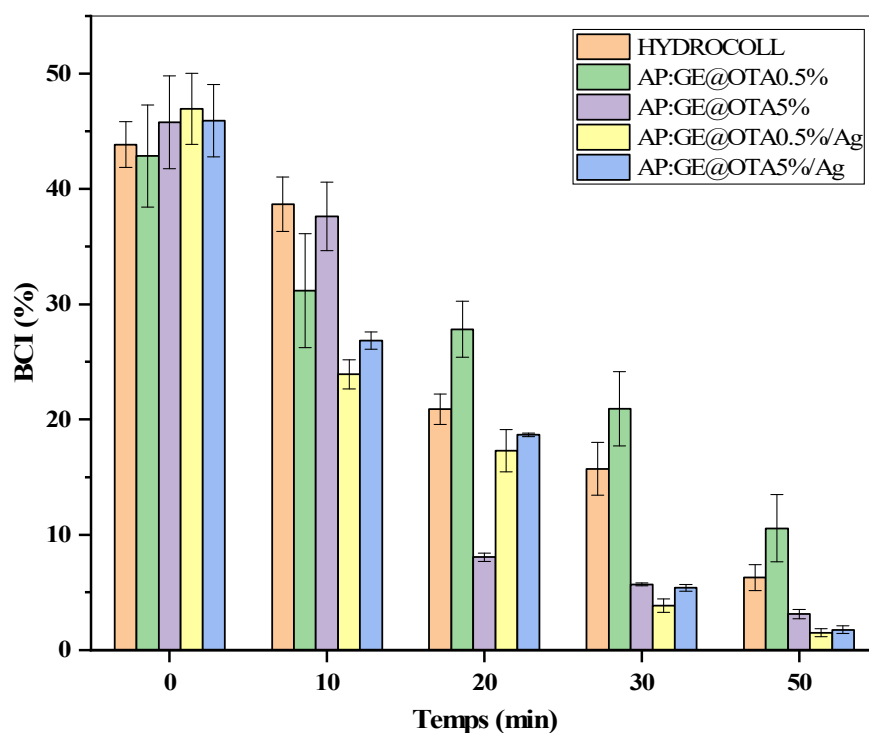


Figure 3.19 : Indice de coagulation sanguine (BCI) des films AP:GE@OTA0.5%, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag, AP:GE@OTA5%/Ag et Hydrocoll® (utilisé comme contrôle).

Il est bien connu que l'un des facteurs clés de l'hémostase est la capacité des biomatériaux hémostatiques à favoriser l'enrichissement en hématocytes. Comme l'illustre la Figure 3.19, une prolongation du temps de contact avec le sang a entraîné une diminution proportionnelle du BCI. Comme le souligne Meena et al. [266], la coagulation sanguine est liée au gonflement et à l'absorption rapide de l'eau du sang, phénomène qui contribue à la formation d'un pool concentré de composants sanguins, facilitant ainsi la formation d'un caillot dense. Les pansements AP:GE@OTA0,5%/Ag et AP:GE@OTA5%/Ag ont montré une chute rapide du BCI en 10 minutes, tandis que le contrôle (Hydrocoll®) ainsi que les films AP:GE@OTA0,5% et AP:GE@OTA5%, ont présenté une tendance similaire après 20 minutes. Ces résultats démontrent clairement la capacité des films AP:GE@OTA/Ag à initier la coagulation sanguine, révélant des propriétés hémostatiques remarquables. Les performances exceptionnelles des films AP:GE@OTA/Ag pourraient résulter d'un effet synergique des AgNPs, attribué à leur charge positive [267].

3.8. Activité cicatrisante *in vivo* des films d'hydrogel :

3.8.1. Etude de la cinétique de cicatrisation cutanée :

En s'appuyant sur les résultats des expériences de caractérisation biologique antérieures, des études *in vivo* ont été menées sur des rats albinos Wistar pour évaluer l'effet des pansements AP:GE@OTA5% et AP:GE@OTA0.5%/Ag sur la cicatrisation des plaies. La cicatrisation, qui régénère et referme la barrière cutanée après une lésion, est un processus complexe en trois phases interconnectées : inflammation, prolifération et remodelage tissulaire [268]. L'intégration d'éléments bioactifs capables d'agir sur ces différentes phases peut influencer positivement ce mécanisme. Le tableau ci-dessous présente les résultats comparatifs de la réduction des surfaces des plaies sur une période de 12 jours.

Tableau 3.8 : Récapitulatif des mesures quotidiennes des surfaces (mm^2) des plaies excisionnelles réalisées avec un emporte-pièce de 3 mm de diamètre.

Jours	Moyennes des surfaces (mm^2)			
	AP:GE	AP:GE@OTA5%	AP:GE@OTA0.5%/Ag	Témoin positif (Hydrocoll®)
0	10.84 ± 0.94	9.57 ± 0.85	10.07 ± 1.77	9.57 ± 0.57
1	10.00 ± 0.98	8.36 ± 1.12	8.18 ± 1.32	8.55 ± 1.10
2	8.54 ± 0.95	7.26 ± 1.14	6.46 ± 1.35	7.73 ± 0.77
3	8.30 ± 0.57	6.69 ± 1.34	6.06 ± 0.95	6.62 ± 0.63
4	7.88 ± 1.24	6.56 ± 1.25	5.15 ± 1.14	5.85 ± 0.67
5	5.98 ± 1.01	4.05 ± 0.97	3.51 ± 1.01	3.93 ± 0.88
6	5.24 ± 1.00	2.59 ± 0.85	2.25 ± 0.63	3.18 ± 1.02
7	5.00 ± 0.91	2.24 ± 0.8	1.91 ± 0.50	2.90 ± 1.14
8	4.56 ± 0.92	1.71 ± 0.41	1.35 ± 0.44	2.88 ± 1.12
9	3.98 ± 0.86	1.23 ± 0.50	1.18 ± 0.38	2.62 ± 0.97
10	3.32 ± 0.96	1.01 ± 0.28	0.98 ± 0.32	2.27 ± 1.08
11	3.22 ± 0.63	0.94 ± 0.24	0.82 ± 0.23	2.03 ± 1.30
12	2.91 ± 0.63	0.92 ± 0.30	0.73 ± 0.18	1.83 ± 1.06

Dès les premiers jours, tous les groupes ont montré une réduction progressive de la surface des plaies après traitement. Pour les plaies traitées avec AP:GE@OTA5%/Ag, la surface initiale de $10,07 \pm 1,77$ a diminué à $6,06 \pm 0,95$ au 3^{ème} jour, avec une fermeture complète au 12^{ème} jour. Un schéma similaire a été observé pour les plaies témoins traitées avec Hydrocoll® ainsi que pour celles traitées avec AP:GE@OTA5%. Les surfaces initiales de ces plaies, respectivement $9,57 \pm 0,57$ et $9,57 \pm 0,85$, ont diminué à $6,62 \pm 0,63$ et $6,69 \pm 1,34$ au 3^{ème} jour, puis à $1,83 \pm 1,06$ et $0,92 \pm 0,30$ au 12^{ème} jour. Ces résultats ont permis de suivre l'évolution des surfaces des plaies au fil du temps, comme illustré dans la figure suivante :

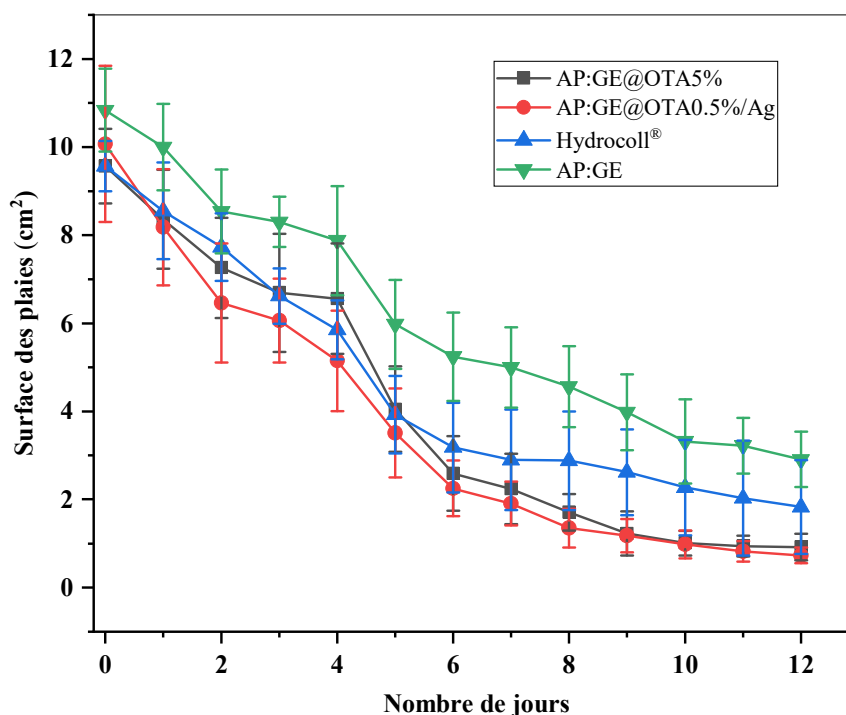


Figure 3.20 : Courbe d'évolution des surfaces des plaies en fonction du temps.

Les courbes illustrées dans la figure 3.20 montrent une fermeture plus rapide des plaies traitées avec AP:GE@OTA5%/Ag et AP:GE@OTA5% par rapport à celles traitées avec Hydrocoll®. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été constatée parmi les groupes, probablement en raison des écarts-types élevés.

A partir des différentes moyennes des surfaces, les taux de cicatrisation ont été calculés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3.9 : Récapitulatif des taux de cicatrisation (%) dans le temps pour les quatre lots. AP:GE, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag et témoin positif (Hydrocoll®).

Jours	Taux de cicatrisation (%)			
	AP:GE	AP:GE@OTA5%	AP:GE@OTA0.5%/Ag	Hydrocoll®
0	0	0	0	0
1	7.74 ± 8.41	12.64 ± 7.32	18.76 ± 5.24	10,65 ± 8.10
2	21.21 ± 8.32	24.13 ± 6.92	35.84 ± 4.10	19,22 ± 10.09
3	23.43 ± 9.76	30.09 ± 5.87	39.82 ± 4.55	30,82 ± 12.24
4	27.30 ± 6.03	31.45 ± 6.19	48.85 ± 3.93	38,87 ± 10.55
5	44.83 ± 7.01	57.68 ± 7.81	65.14 ± 3.32	58,93 ± 8.77

6	51.66 ± 6.83	72.93 ± 6.57	77.65 ± 2.50	66.77 ± 8.00
7	53.87 ± 7.41	76.59 ± 6.79	81.03 ± 2.74	69.69 ± 6.68
8	57.93 ± 7.10	82.13 ± 9.43	86.59 ± 2.35	69.90 ± 7.13
9	63.28 ± 6.94	87.14 ± 4.55	88.28 ± 2.09	72.62 ± 9.66
10	69.37 ± 6.85	89.44 ± 3.95	90.26 ± 1.88	76.28 ± 6.57
11	70.29 ± 8.64	90.17 ± 4.24	91.85 ± 1.47	78.78 ± 5.64
12	73.15 ± 6.74	90.38 ± 3.59	92.75 ± 1.13	80.87 ± 8.63

Le tableau 3.9 indique des taux de cicatrisation supérieurs pour les plaies traitées avec AP:GE@OTA5% et AP:GE@OTA0.5%/Ag, comparativement aux pansements Hydrocoll® et AP:GE. En 8 jours, les réductions de surface des plaies pour AP:GE@OTA5% et AP:GE@OTA0.5%/Ag étaient respectivement de $82,13 \pm 9,43$ % et $86,59 \pm 2,35$ %, tandis que pour le groupe AP:GE affichait une réduction de seulement $57,93 \pm 7,10$ % sur la même période. Notamment, les plaies traitées avec AP:GE@OTA0.5%/Ag étaient presque entièrement fermées après 12 jours, tandis que le taux de fermeture cutanée du groupe Hydrocoll® (témoin) atteignait $80,87 \pm 8,63$ %.

Ces résultats ont permis de suivre l'évolution des surfaces des plaies au fil du temps, comme illustré dans la figure suivante :

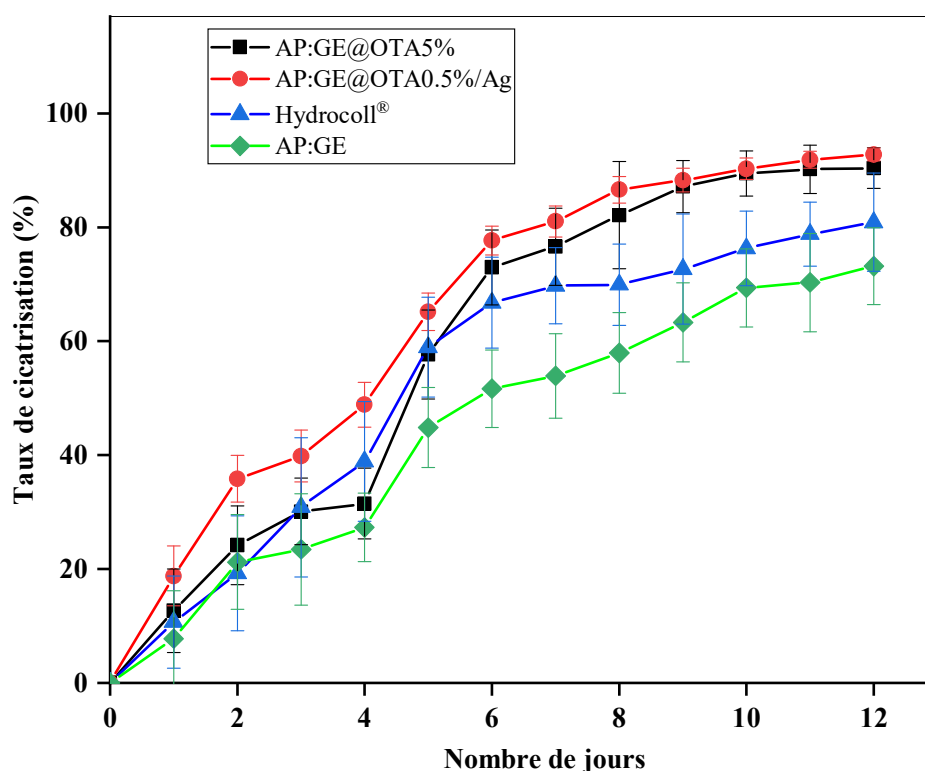


Figure 3.21 : Evolution comparative du taux de cicatrisation avec le temps pour AP:GE, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag et les témoins positifs (Hydrocoll®).

L'aspect global de la courbe présentée dans la Figure 3.21 met en évidence une amélioration progressive dans le temps de la cicatrisation induite par les pansements d'hydrogel synthétisés.

La cinétique de cicatrisation des plaies montre une accélération plus marquée pour les films d'hydrogel AP:GE@OTA0.5%/Ag, comparée à celle des témoins positifs (11,88 % de plus que le témoin positif). Ce processus présente trois phases distinctes :

- Une phase ascendante du 1^{er} au 2^{ème} jour avec un taux de cicatrisation de $35,84 \pm 4,10$ %,
- Une phase descendante entre le 2^{ème} et le 6^{ème} jour atteignant $77,65 \pm 2,50$ %,
- Une troisième phase ascendante du 6^{ème} au 12^{ème} jour, culminant à $92,75 \pm 1,13$ %.

Aucune différence significative n'a été constatée parmi les taux de cicatrisation des groupes traités avec les pansements AP:GE, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA5% et Hydrocoll®, probablement en raison des variations importantes des écarts-types.

3.8.2. Observations macroscopique des plaies :

Plusieurs modèles expérimentaux ont été développés pour l'étude de la cicatrisation cutanée, tels que le modèle des chambres de blessures ou de cylindres grillagés, le modèle de blessure expérimentale au laser, le modèle *in vitro* utilisant des cultures cellulaires de fibroblastes ou de kératinocytes. Dans cette étude, nous avons adopté le modèle de plaies excisionnelles, qui représente un modèle de choix pour les travaux, visant d'une part à étudier les différentes phases du phénomène de cicatrisation, d'autre part à évaluer les effets des pansements hydrogel synthétisés, en l'occurrence AP:GE@OTA5% et AP:GE@OTA0.5%/Ag sur la cicatrisation cutanée par une étude clinique et histologique.

Les observations macroscopiques des plaies nous ont également permis d'apprécier l'effet des pansements AP:GE@OTA/Ag sur l'évolution de la cicatrisation. Les résultats sont illustrés dans la figure suivante :

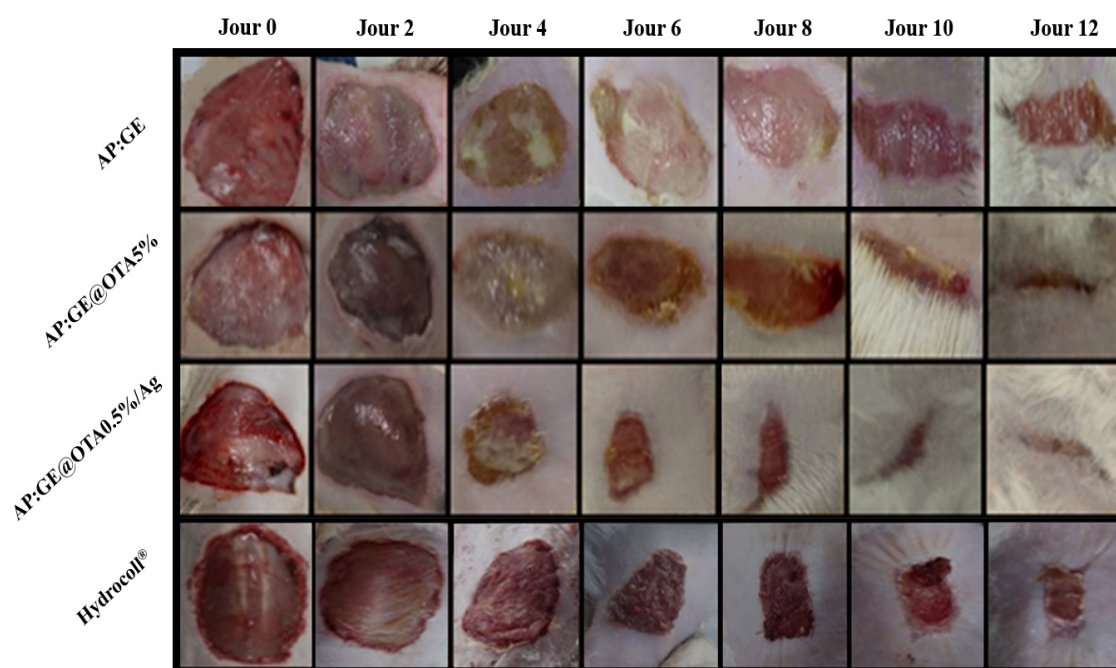


Figure 3.22 : Photos comparatives de l'évolution des plaies chez les rats traités avec AP:GE, AP:GE@OTA5%, AP:GE@OTA0.5%/Ag et les témoins positifs (Hydrocoll®).

Les résultats ont montré une surface initiale de plaie plus grande que prévu (10 cm^2 au lieu de 7 cm^2), probablement en raison des forces centrifuges autour de la plaie liées aux lignes de tension cutanée [23].

La symptomatologie observée chez les rats tout au long du processus de cicatrisation des plaies excisionnelles est présentée dans le tableau récapitulatif suivant :

Tableau 3.10 : Récapitulation de la symptomatologie développée par les rats au cours du processus de cicatrisation des plaies excisionnelles.

Calendrier	Aspect macroscopique des plaies après excision (symptomatologie)	
	Groupes témoins (Hydrocoll®)	Groupes essais (AP:GE@OTA0.5%/Ag)
<i>J₀</i>	L'excision d'un fragment de peau avec un emporte-pièce a entraîné une plaie circulaire avec perte de substance. Les manifestations cliniques immédiates observées après l'excision incluent : 1) un saignement modéré, 2) l'apparition d'un œdème localisé autour des berges de la plaie, 3) la formation d'un caillot de fibrine pour stopper le saignement. L'effraction vasculaire liée à l'excision a provoqué un saignement léger, rapidement contrôlé par la vasoconstriction artériolaire. Ce processus a duré quelques minutes, le temps de la formation du caillot, puis laisse place à la vasodilatation qui se traduit par une perméabilité	

	capillaire accrue, facilitant l'infiltration des cellules sanguines et des composants plasmatiques responsables de l'œdème qui apparait autour de la plaie. La fibrine s'est formée à partir de protéines plasmatiques comme le fibrinogène, stabilisant la coagulation. Les surfaces moyennes des plaies obtenues chez les rats des lots témoin (Hydrocoll®) et essais (AP:GE@OTA5%/Ag) étaient respectivement 9.57 ± 0.57 et 9.57 ± 0.85 mm².	
<i>J₁</i>	- La plaie est recouverte par un caillot de fibrine comblant l'espace créé par la perte de substance. - Les berges sont enflées et érythémateuses, signes d'une réponse inflammatoire active. - Le changement de la conformation des plaies est provoqué par le phénomène de contraction, due à la rétraction des cellules myofibroblastiques. - Superficie moyenne : 8.55 ± 1.10 mm².	- Symptomatologie identique à celle du groupe témoin. - Les plaies ont tendance à se contracter, d'où le changement de leur conformation. - Superficie moyenne : $8,36 \pm 1,12$ mm².
<i>J₂</i>	- Inflammation persistante avec des bords de plaie enflés et érythémateux. - Les plaies ont tendance à se contracter - Le caillot de fibrine était toujours en place. - Le caillot de fibrine est toujours en place et a gagné en épaisseur, stabilisant le processus hémostatique. - Superficie moyenne : $7,73 \pm 0,77$ mm².	- Les plaies continuent de se contracter, modifiant leur forme initiale. - Le caillot de fibrine est légèrement plus épais que les jours précédents. - L'inflammation est toujours présente, avec un œdème modéré et un érythème aux berges de la plaie. - La présence d'œdème et d'érythème au niveau des berges de la plaie témoigne d'une réaction inflammatoire locale. - Superficie moyenne : $7,26 \pm 1,14$ mm².
<i>J₃</i>	- Réduction visible de l'intensité de l'œdème aux bords des plaies par rapport aux jours précédents. - Le caillot de fibrine reste présent, gagnant encore un peu en épaisseur. - Persistance de l'érythème développé au niveau des berges de la plaie. - Superficie moyenne : $6,62 \pm 0,63$ mm².	- Les berges des plaies, couvertes par un caillot de fibrine, sont restées érythémateuses mais l'œdème siégeant à ce niveau avait totalement disparu. - La contraction des plaies entraîne une réduction progressive de leur superficie. - Superficie moyenne : $6,69 \pm 1,34$ mm².

J_4	- Œdème et érythème toujours visibles aux berges de la plaie. - La surface des plaies est couverte par un épais caillot de fibrine, signe de stabilisation. - La superficie moyenne des plaies avait régressé de quelques millimètres carrés, elle est passée de 6.62 ± 0.63 à $5.85 \pm 0.67 \text{ mm}^2$.	- Disparition complète de l'œdème siégeant au niveau des berges de la plaie, mais un léger érythème persiste. - Les surfaces des plaies étaient couvertes d'un épais caillot de fibrine. - Le caillot de fibrine reste en place, épais, et la forme des plaies est modifiée par la contraction. - La forme des plaies a été encore modifiée à cause du phénomène de contraction. - Superficie moyenne : $6,56 \pm 1,25 \text{ mm}^2$.
J_5	- Les plaies du groupe témoin étaient couvertes par un épais caillot de fibrine. - L'œdème et l'érythème qui siégeaient au niveau des berges de la plaie ont complètement disparus. - La superficie moyenne des plaies est passée de 5.85 ± 0.67 à $3.93 \pm 0.88 \text{ mm}^2$.	- Le caillot de fibrine, couvrant les plaies devient saillant par rapport au plan du revêtement cutané. - Le soulèvement et la fissuration observés au niveau des berges constituent un début de détachement du caillot de fibrine. - La superficie moyenne des plaies est passée de 6.56 ± 1.25 à $4.05 \pm 0.97 \text{ mm}^2$.
J_6	- Le caillot de fibrine reste en place, mais est devenu saillant par rapport au plan du revêtement cutané. - Absence complète d'œdème et d'érythème au niveau des berges des plaies - Superficie moyenne : $3,18 \pm 1,02 \text{ mm}^2$.	- Détachement partiel du caillot, révélant un tissu de granulation rosé en dessous, signe d'une régénération active. - Absence d'œdème et d'érythème au niveau des berges des plaies - Superficie moyenne : $2,59 \pm 0,85 \text{ mm}^2$.
J_7	- Le caillot de fibrine recouvrant les plaies est toujours saillant au plan de revêtement cutané, mais le détachement a commencé. - L'inflammation a régressé de manière nette. - Superficie moyenne : $2,90 \pm 1,14 \text{ mm}^2$.	- Réapparition d'un léger œdème et érythème, tandis que le tissu sous-jacent devient rouge vif, suggérant une vascularisation accrue. - Superficie moyenne : $2,24 \pm 0,80 \text{ mm}^2$.
J_8	- Détachement progressif du caillot, révélant un tissu cicatriciel rosé en dessous. - Absence d'œdème et d'érythème au niveau des berges des plaies	- Légère présence d'œdème et d'érythème aux berges de la plaie

	- Superficie moyenne : $2,88 \pm 1,12$ mm².	- La contraction continue, réduisant davantage la surface de la plaie. - Superficie moyenne : $1,71 \pm 0,41$ mm².
<i>J₉</i>	- Léger érythème réapparaissant aux berges, sans œdème. - Les plaies continuent à se contracter et à modifier leurs formes. - La superficie moyenne des plaies a régressé de quelques millimètres carrés, elle est passée de 2.88 ± 1.12 à 2.62 ± 0.97 mm².	- Persistance d'un léger œdème et d'érythème aux berges des plaies. - La surface des plaies continue à diminuer. - Superficie moyenne : $1,23 \pm 0,50$ mm².
<i>J₁₀</i>	- Disparition complète de l'érythème siégeant au niveau des berges de la plaie. - Superficie moyenne : $2,27 \pm 1,08$ mm².	- Absence complète d'œdème et d'érythème siégeant au niveau des berges de la plaie. - Les plaies sont presque totalement refermées. - Superficie moyenne : $1,01 \pm 0,28$ mm².
<i>J₁₁</i>	- Contraction et régression de la superficie des plaies, sans signe d'œdème ou d'érythème - Superficie moyenne : $2,03 \pm 1,30$ mm².	- Les plaies sont pratiquement refermées, sans aucun signe d'inflammation. - Superficie moyenne : $0,94 \pm 0,24$ mm².
<i>J₁₂</i>	- L'absence de bords saillants ou d'érythème témoigne du bon déroulement du phénomène de cicatrisation ; ce dernier est appelé à évoluer jusqu'à la fermeture totale de la plaie et la réorganisation du tissu cicatriciel. - La couleur rouge de la plaie suggère une immaturité tissulaire. - Les plaies sont presque totalement refermées, la superficie moyenne était de 1.83 ± 1.06.	- Les plaies sont totalement refermées, avec une cicatrice plate et absence de signes inflammatoires. - La maturation tissulaire est en phase finale. - Superficie moyenne : $0,94 \pm 0,24$ mm².

Au vu des résultats obtenus suite à la mesure des surfaces des plaies, des indices et des taux de cicatrisation, nous constatons que les films d'hydrogel AP:GE@OTA/Ag permettent aux plaies d'achever la cicatrisation plus rapidement que les plaies témoins (Hydrocoll®) (Figure 3.22). La phase de diminution des taux de cicatrisation obtenue entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour pourrait s'expliquer par la formation d'une croûte saillante au niveau des berges de la plaie, la phase ascendante ayant suivi, est due au décollement de la croûte. Les résidus d'acide galacturonique estérifié sur le squelette de la pectine amidée

offrent un effet anti-inflammatoire puissant [269], tandis que la gélatine favorise l'hémostase, l'adhérence cellulaire et la prolifération, optimisant ainsi la cicatrisation. De plus, les AgNPs présentent d'excellentes propriétés antimicrobiennes, éradiquant efficacement les bactéries au niveau de la plaie et accélérant la guérison. Les pansements fabriqués ne collaient pas à la plaie pendant toute la durée d'application, permettant un retrait facile sans nuire à la peau. En outre, les plaies traitées avec les films AP:GE@OTA0.5%/Ag ont montré une meilleure qualité tissulaire et une réduction des cicatrices (Figure 3.22). Tummalapallia et al. ont précédemment décrit le développement d'un pansement hydrogel *in situ* à base de pectine oxydée-gélatine-nanoparticules d'argent (OP-Gel-NS) [26]. Le mécanisme de réticulation utilisé dans les systèmes OP-Gel-NS est similaire à celui des systèmes AP:GE@OTA/Ag actuels. Nous avons donc visé à évaluer et comparer l'efficacité de ces deux types de films hydrogel pour favoriser la cicatrisation des plaies. Tummalapallia et al. ont utilisé des AgNPs comme agent antimicrobien, obtenant environ 80 % de guérison en 8 jours sur des plaies excisionnelles à pleine épaisseur chez des souris C57BL/6J, contre environ 70 % pour les plaies témoins traitées avec du Bactigras®. En comparaison, les plaies traitées avec AP:GE@OTA0.5%/Ag ont montré un taux de cicatrisation de $86,59 \pm 2,35$ % sur la même période. Cette comparaison suggère que l'efficacité des complexes polysaccharideprotéine comme matrices de cicatrisation des plaies, et pour la régénération tissulaire, est fortement améliorée par l'incorporation de l'OTA et d'AgNPs comme agents antimicrobiens.

3.8.3. Etude histologique des processus de la régénération tissulaire :

Dans cette partie, l'étude histologique du processus de cicatrisation tissulaire a été réalisée à travers l'examen microscopique des coupes histologiques des tissus cicatriciels des plaies traitées avec Hydrocoll et AP:GE@OTA0.5%/Ag, au jour 3, 8 et 12. Cette analyse permet d'observer l'évolution des phénomènes cellulaires et tissulaires associés à la guérison des plaies, afin d'évaluer l'efficacité des traitements dans la régénération des tissus.

3.8.3.1. Observations histologiques :

A) Aspect microscopique des tissus cicatriciels 72 heures après excision

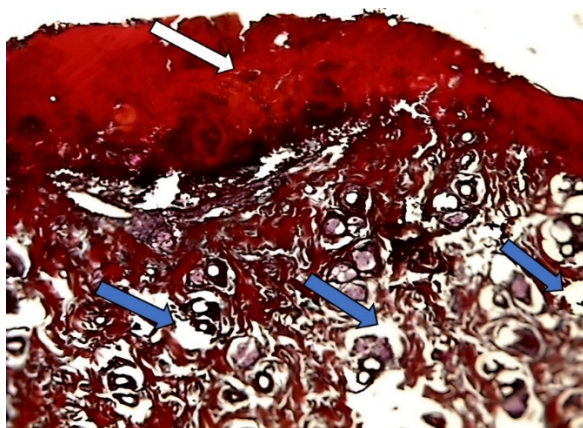


Figure 3.23 : Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie témoin traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (GX10).

Cette coupe montre une vue globale du tissu cicatriciel 72 heures après excision. Un infiltrat inflammatoire notable est présent dans le derme. Un caillot de fibrine (flèche blanche) recouvre un tissu œdémateux non organisé (flèches bleues), soulignant la présence d'espaces intercellulaires rempli de liquide exsudatif. Cet aspect œdémateux traduit une réponse inflammatoire aiguë précoce, avec des signes de déplacement des cellules inflammatoires vers la zone de la plaie.

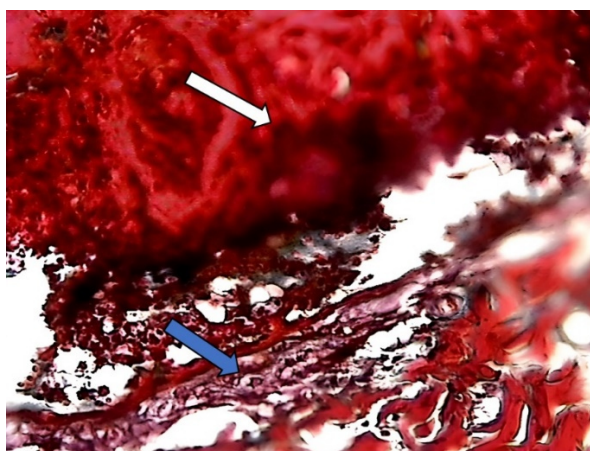


Figure 3.24 : Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0.5%/Ag. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (GX40).

Cette coupe montre des œdèmes (flèche bleue) résultant de l'exsudat inflammatoire. Un caillot de fibrine (flèche blanche) est déshydraté, formant une masse inerte sur la surface de la plaie. L'épiderme montre des signes de désorganisation architecturale, notamment une perte de cohésion entre les cellules épidermiques, ce qui indique un processus de réparation tissulaire perturbé à ce stade.

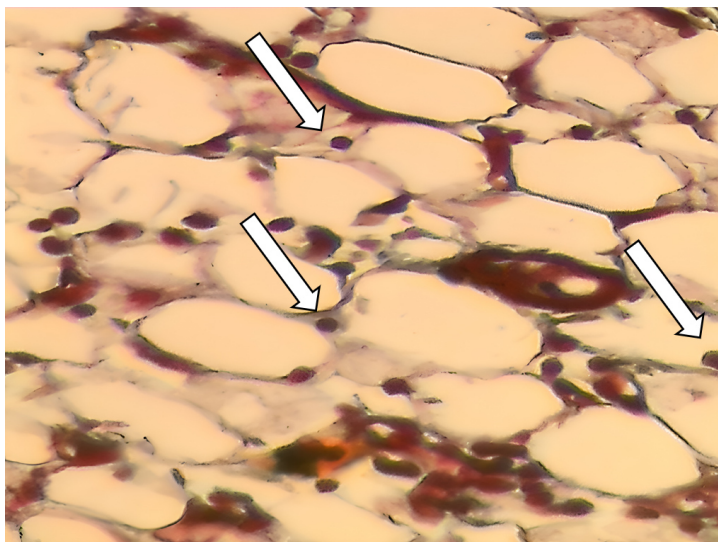


Figure 3.25 : Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration à l'hématoxyline-éosine. (GX100).

La coupe révèle une infiltration intense de cellules inflammatoires, principalement des polynucléaires neutrophiles (flèches blanches), dans le derme, reflétant une réponse immunitaire active. La présence massive de ces cellules indique un recrutement cellulaire précoce et une phagocytose des débris tissulaires en cours.

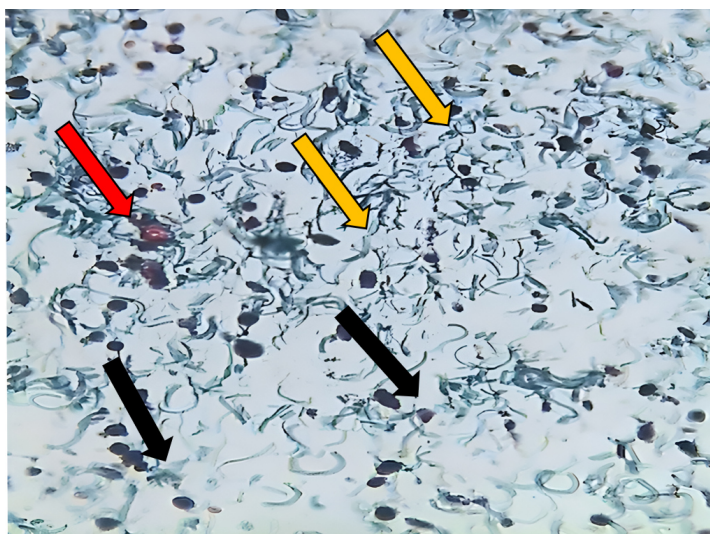


Figure 3.26 : Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0.5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40).

Cette coupe montre une infiltration importante de cellules inflammatoires (flèches noires), avec des fibroblastes (flèches jaunes) qui commencent à proliférer. Un vaisseau sanguin (flèche rouge) indique le début de l'angiogenèse, processus clé pour restaurer l'approvisionnement en nutriments et oxygène nécessaire à la régénération tissulaire. La présence de fibroblastes suggère une synthèse accrue de collagène.

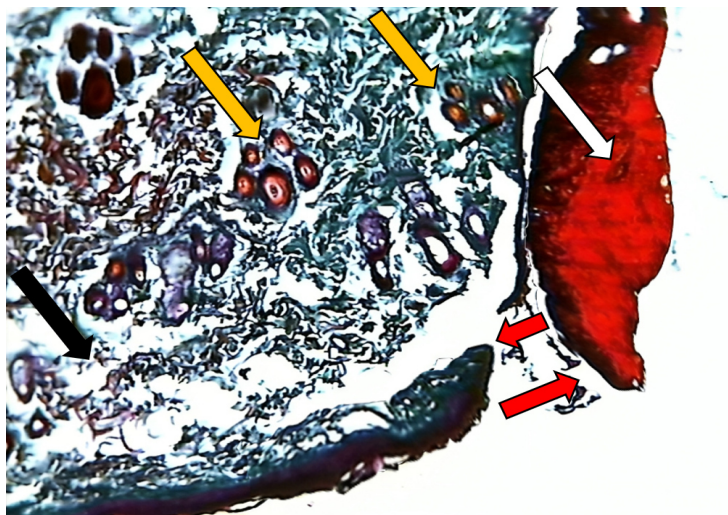


Figure 3.27 : Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0.5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX10).

Cette coupe montre un caillot de fibrine (flèche blanche) inerte recouvrant une fine couche de kératinocytes. Sous le caillot, un tissu de granulation lâche est visible, avec une angiogenèse marquée (flèches rouges), illustrant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La formation d'une « langue de migration » (flèches rouges) en dessous du caillot permet aux berges de la plaie de progresser vers le centre. Le derme œdémateux (flèche noire) contient de nombreux vaisseaux sanguins (flèches jaunes), témoignant d'une activité angiogénique importante.

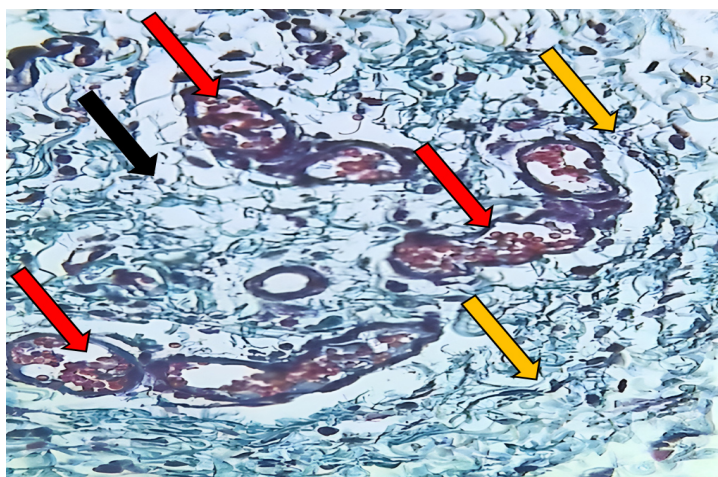


Figure 3.28 : Coupe histologique à J3 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0.5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40).

L'angiogenèse est particulièrement marquée, avec de nombreux vaisseaux sanguins dans le derme (flèches rouges) et une prolifération de fibroblastes (flèches jaunes). Quelques cellules inflammatoires sont encore présentes (flèche noire), témoignant d'une activité immunitaire modérée. Cette coupe illustre une progression rapide vers la réparation tissulaire.

B) Aspect microscopique des tissus cicatriciels 8 jours après excision

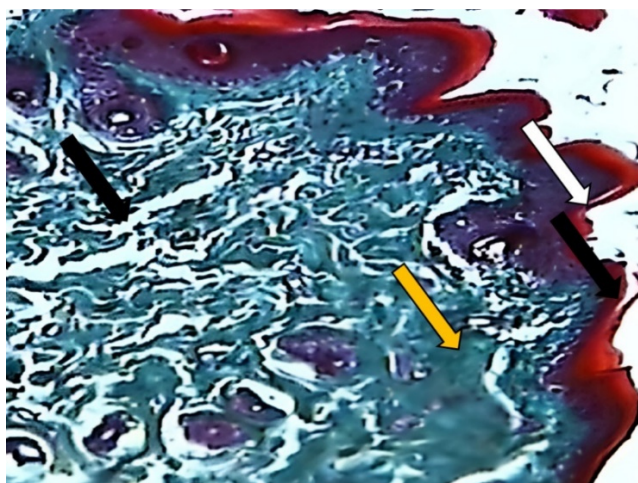


Figure 3.29 : Coupe histologique à J8 du tissu cicatriciel d'une plaie témoin traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration au trichrome de Masson. (GX10).

À J8, la réépithélialisation commence, illustrée par une fine couche de kératinocytes au-dessus d'un derme constitué de collagène désorganisé et de fibroblastes. L'épiderme (flèches blanches) montre une mince couche cornée colorée en rouge et de quelques assises cellulaires (kératinocytes), reposant sur un derme riche en collagène désorganisé et de fibroblastes (flèche jaune). Toutefois, le derme reste encore œdémateux.

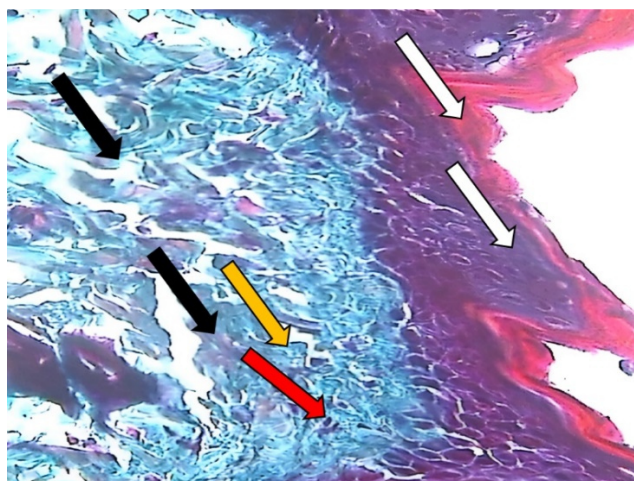


Figure 3.30 : Coupe histologique à J8 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0.5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40).

L'épiderme est totalement restructuré à J8, semblable à une peau normale. Sous cet épiderme rétabli (flèches blanches), un derme riche en collagène (flèche jaune) montre encore des signes d'œdème (flèches noires). La persistance de quelques cellules inflammatoires (flèche rouge) indique que l'inflammation est en voie de résolution, mais encore présente. Cela reflète une progression vers la phase de remodelage.

C) Aspect microscopique des tissus cicatriciels 12 jours après excision

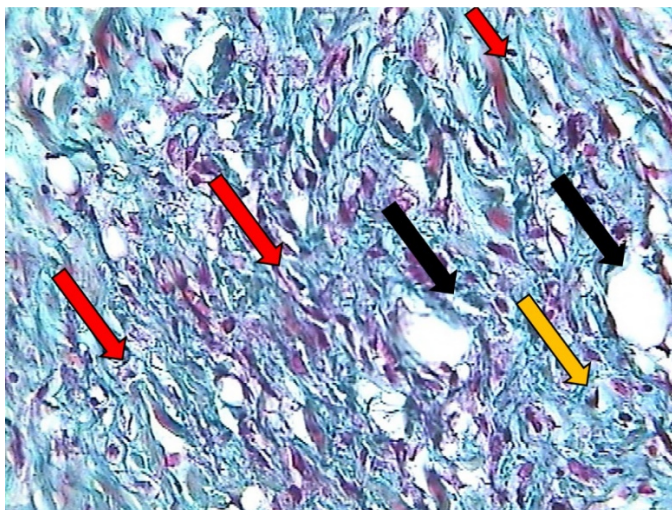


Figure 3.31 : Coupe histologique à J12 du tissu cicatriciel d'une plaie témoin traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration au trichrome de Masson. (GX40).

À J12, le derme montre une organisation dense des fibres de collagène. Les fibroblastes (flèches rouges) sont visibles dans le tissu, travaillant à organiser et renforcer la matrice extracellulaire. Toutefois, quelques zones d'œdème persistent (flèches noires), indiquant que le processus de cicatrisation est toujours en cours dans certaines régions.

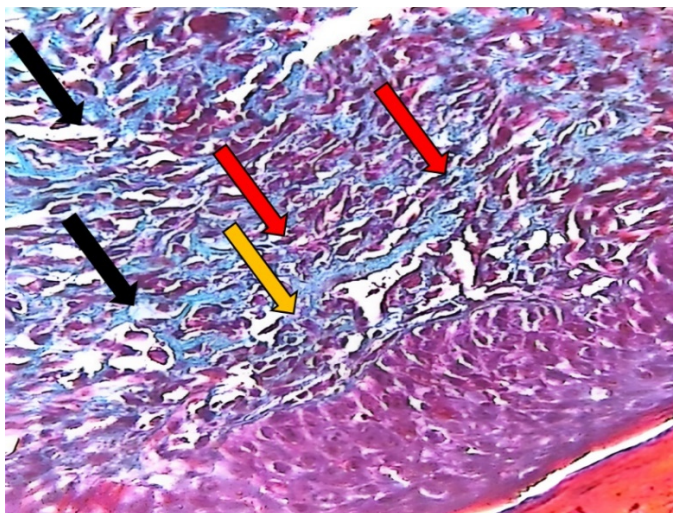


Figure 3.32 : Coupe histologique à J12 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le pansement Hydrocoll®. Coloration au trichrome de Masson. (GX40).

Le derme présente une compaction notable avec des fibroblastes (flèches rouges) qui contribuent à la synthèse de fibres de collagène (flèche jaune). L'œdème (flèches noires) est encore visible, mais réduit, suggérant que la cicatrisation est dans sa phase finale. L'organisation tissulaire progresse vers la structure d'une peau mature.

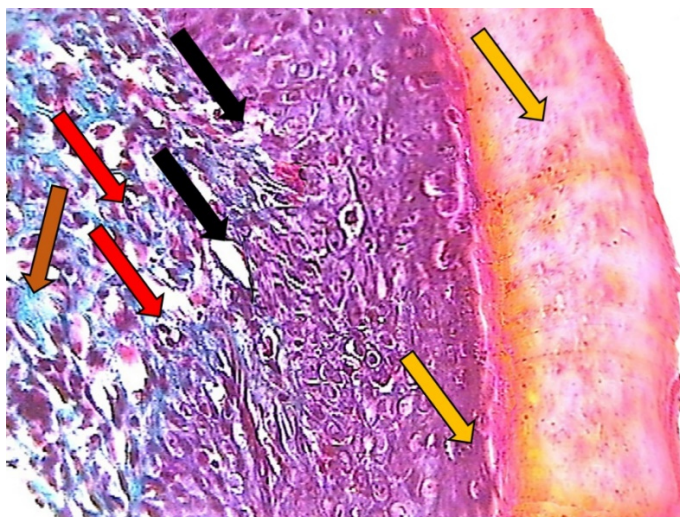


Figure 3.33 : Coupe histologique à J12 du tissu cicatriciel d'une plaie traitée avec le film AP:GE@OTA0,5%/Ag. Coloration au trichrome de Masson. (GX40).

La peau est entièrement reconstituée à J12, avec un épiderme épaissi (flèches jaunes) composé de plusieurs couches de kératinocytes. Le derme est plus dense, constitué de fibroblastes (flèches rouges) et de fibres de collagène mieux organisées (flèche marron). L'apparence générale suggère une cicatrisation presque complète avec une réorganisation tissulaire avancée.

3.8.3.2. Discussion de l'étude histologique :

L'étude histologique réalisée sur la cicatrisation des plaies démontre une régénération tissulaire complète à J12 dans le groupe traité avec le film AP:GE@OTA0.5%/Ag. Les biopsies effectuées à ce stade montrent non seulement une fermeture totale de la plaie, mais aussi une organisation structurale plus avancée, marquant une étape décisive dans la réparation cutanée. L'un des aspects les plus notables est la réduction significative de l'inflammation dans ce groupe, comparativement aux autres, y compris celui traité par Hydrocoll®.

En parallèle, l'épaisseur du tissu de granulation, un marqueur clé de la réparation tissulaire, est significativement plus importante dans le groupe AP:GE@OTA0.5%/Ag par rapport aux autres groupes. Ce tissu, constitué principalement de fibroblastes proliférants et de nouveaux vaisseaux sanguins, contribue à une régénération accélérée et durable de la peau. Ce réseau vasculaire dense permet non seulement une meilleure oxygénation et un apport accru en nutriments, mais favorise également la détoxification des cellules endommagées, accélérant ainsi la transition vers la réépithélialisation complète [270]. Dans le groupe Hydrocoll®, bien que la formation de tissu de granulation

soit observable, elle est moins marquée et semble moins organisée, ce qui pourrait ralentir le remodelage final.

Le film AP:GE@OTA0.5%/Ag s'est révélé particulièrement efficace pour réduire l'exsudation, un autre facteur déterminant dans le processus de cicatrisation. L'exsudat, généralement lié à une réponse inflammatoire active, est significativement réduit dans ce groupe, ce qui suggère une action anti-inflammatoire modérée mais durable du traitement [271]. De plus, ce film a favorisé une régénération rapide de l'épiderme, essentiel pour rétablir la barrière cutanée. La réépithélialisation s'est produite plus tôt dans ce groupe, conduisant à une restauration plus rapide de la fonctionnalité de la peau [55].

En comparant les résultats entre les groupes, il est clair que le traitement par AP:GE@OTA0.5%/Ag a non seulement accéléré la cicatrisation mais a également conduit à une régénération plus qualitative des tissus. Le film présente un effet anti-inflammatoire et pro-réparateur, stimulant la croissance des fibroblastes et des kératinocytes, tout en modulant l'activité des myofibroblastes. Ces caractéristiques positionnent ce traitement comme supérieur aux méthodes classiques, telles que Hydrocoll®, pour obtenir une cicatrisation accélérée, complète et de meilleure qualité.

Les observations histologiques confirment ainsi que l'utilisation de AP:GE@OTA0.5%/Ag améliore significativement la vitesse et la qualité du processus cicatriciel, en favorisant une maturation plus rapide du tissu cicatriciel tout en réduisant les signes inflammatoires résiduels. Ce film se présente comme une option prometteuse pour une cicatrisation optimisée, surtout dans des contextes où la réduction rapide de l'inflammation et la réépithélialisation sont cruciales.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Les travaux réalisés dans cette thèse ont conduit à l'élaboration, la caractérisation et l'évaluation de pansements antibactériens biocompatibles à base de biopolymères sous forme d'hydrogels nanocomposites, destinés à accélérer le processus de cicatrisation des plaies. En s'appuyant sur des méthodologies expérimentales rigoureuses, une avancée significative a été obtenue dans l'élaboration de matériaux combinant des propriétés physicochimiques, mécaniques, biologiques et antibactériennes optimisées.

La pectine commerciale, un biopolymère largement utilisé, a été modifiée par un processus d'amidation pour incorporer des groupes amines primaires, améliorant ainsi sa réactivité chimique. Cette modification a été confirmée par des analyses avancées telles que la spectroscopie infrarouge (IR-TF), la diffraction des rayons X (DRX) et la résonance magnétique nucléaire (^1H -RMN), qui ont mis en évidence des changements structuraux importants et une augmentation de la réactivité chimique, reflétée par un degré d'amidation de 38,62 %. Ces modifications ont préparé la pectine à la formation de matrices hydrogels performantes.

Les films hydrogels ont été préparés par réticulation covalente entre la pectine amidée (AP), la gélatine (GE), et l'acide tannique oxydé (OTA). Ce dernier a également permis la réduction *in situ* des ions argent pour former des nanoparticules d'argent (AgNPs), intégrées dans la matrice hydrogel. Ces nanoparticules, d'une taille moyenne d'environ 55,62 nm, ont démontré une dispersion uniforme et une stabilisation efficace grâce aux interactions avec l'OTA, validées par des techniques de microscopie électronique à transmission (MET) et DRX ainsi que par microfluorescence X (micro-XRF).

L'analyse mécanique a révélé une amélioration significative des propriétés des films, ces derniers affichant une résistance à la traction atteignant 38,49 MPa pour les formulations réticulées avec les plus fortes concentrations d'OTA, tout en conservant une flexibilité essentielle à leur utilisation en pansements. L'ajout d'OTA et de nanoparticules d'argent a également augmenté la stabilité thermique des films, comme démontré par les analyses thermogravimétriques (TG), attribuant cette amélioration à la formation de nouvelles liaisons chimiques dans la structure polymérique.

Les capacités d'absorption et de rétention d'eau des films se sont avérées optimales pour maintenir un environnement hydraté propice à la régénération tissulaire. En outre, les taux de transmission de vapeur d'eau (WVTR) ont été maintenus dans des plages idéales pour la cicatrisation, garantissant une évaporation suffisante tout en évitant la déshydratation excessive de la plaie. Ces propriétés mécaniques et biologiques ont été renforcées par l'incorporation d'un plastifiant, le glycérol, améliorant la flexibilité des films.

L'étude de la biocompatibilité a également montré que les pansements étaient non hémolytiques et favorisaient une bonne interaction avec les cellules sanguines, confirmant leur potentiel pour un usage clinique. Leur activité hémostatique a été renforcée par l'incorporation d'OTA et d'AgNPs, contribuant à un contrôle efficace des saignements et à une formation rapide de caillots.

Les tests biologiques ont mis en évidence des propriétés antibactériennes exceptionnelles, les films montrant des zones d'inhibition atteignant 31,77 mm contre des pathogènes courants tels que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cette efficacité est due à l'effet synergique entre l'OTA et les AgNPs, qui agissent conjointement pour limiter la prolifération bactérienne. De plus, les tests cytocompatibles (XTT) ont confirmé l'innocuité des films sur les cellules NIT-1, validant leur biocompatibilité, même à des concentrations élevées d'OTA et d'AgNPs. La structure réticulée des hydrogels a également permis une libération prolongée et contrôlée des ions argent, favorisant une activité antimicrobienne durable tout en minimisant la cytotoxicité.

L'efficacité des pansements a été validée par des expérimentations *in vivo* sur des rats albinos Wistar, où les formulations contenant OTA et AgNPs ont démontré une régénération cutanée rapide et complète en 12 jours, sans aucun signe de toxicité tissulaire. Les pansements AP:GE@OTA0.5%/Ag ont réduit la surface des plaies de 92,75 % au 12^e jour, leur efficacité s'est avérée supérieure à celle d'un pansement commercialement disponible Hydrocoll®, suggérant que ces films d'hydrogel nanocomposites représentent une avancée prometteuse pour le traitement efficace des plaies complexes, en alliant biocompatibilité, stabilité et activité antibactérienne. Les résultats ont mis en lumière trois phases distinctes du processus de cicatrisation : une phase initiale rapide, une phase intermédiaire de consolidation et une phase finale de remodelage tissulaire. La réduction rapide de la surface des plaies témoigne de l'efficacité des films à favoriser un processus de régénération accéléré.

Ce travail, bien qu'ayant apporté des avancées significatives, reste une étape préliminaire ouvrant la voie à de nombreuses perspectives, tant sur le plan de la recherche que du développement industriel. L'optimisation et l'application des films développés nécessitent encore des investigations approfondies afin d'en exploiter pleinement le potentiel.

Un premier axe fondamental réside dans la validation clinique de ces films en conditions réelles. Des études cliniques rigoureuses devront être menées afin d'évaluer leur efficacité sur des modèles biologiques complexes et dans des contextes cliniques variés. Ces investigations permettront d'établir des protocoles d'application optimisés, garantissant la sécurité et l'efficacité des pansements pour le traitement des plaies chroniques et infectées.

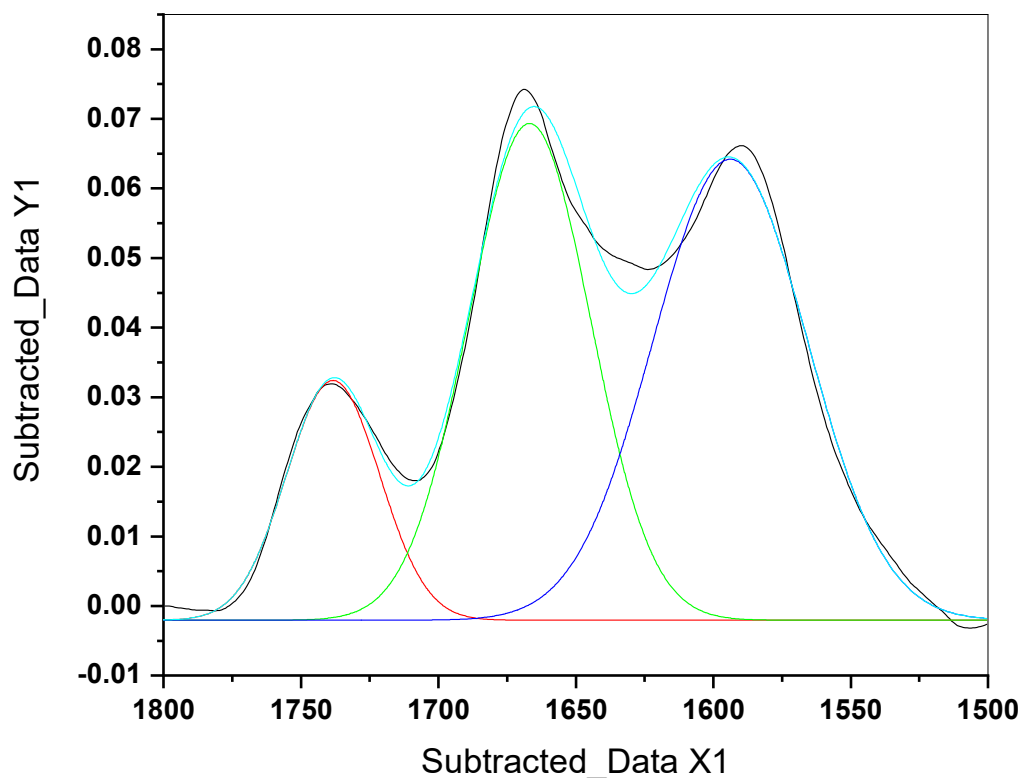
Par ailleurs, l'industrialisation du procédé de fabrication constitue un défi majeur. Il sera nécessaire de développer des procédés de production à grande échelle, en veillant à respecter les exigences des normes médicales et réglementaires en vigueur. L'optimisation des conditions de synthèse, de réticulation et d'incorporation des agents actifs devra permettre de garantir la reproductibilité des films et leur stabilité à long terme, tout en assurant un coût de production compétitif pour une éventuelle commercialisation.

Enfin, une évolution prometteuse de ces systèmes réside dans l'intégration de capteurs intelligents capables de surveiller en temps réel des paramètres physiologiques clés, tels que le pH, l'humidité et la température de la plaie. Cette approche offrirait une nouvelle génération de pansements intelligents connectés, capables d'adapter dynamiquement leur action en fonction de l'état de la plaie et de transmettre des données aux professionnels de santé. Une telle innovation permettrait un suivi personnalisé de la cicatrisation, améliorant ainsi la prise en charge des patients et optimisant les résultats thérapeutiques.

Ainsi, les perspectives de cette thèse s'inscrivent dans une démarche multidisciplinaire, combinant la science des matériaux, l'ingénierie biomédicale et la médecine, avec pour ambition ultime de développer des dispositifs médicaux innovants, efficaces et adaptés aux besoins cliniques actuels.

Annexe

ANNEXE



	A	B1	B2	B3
1	Model	Gauss		
2	Equation	$y=y0 + (A/(w*\text{sqrt}(\text{pi}/2)))*\text{exp}(-2*((x-xc)/w)^2)$		
3	Plot	Peak1(Subtracted_Data Y1)	Peak2(Subtracted_Data Y1)	Peak3(Subtracted_Data Y1)
4	y0	-0.00205 ± 2.80538E-4	-0.00205 ± 2.80538E-4	-0.00205 ± 2.80538E-4
5	xc	1738.33002 ± 0.2624	1666.8416 ± 0.22167	1593.80373 ± 0.27741
6	w	33.92872 ± 0.6315	44.43177 ± 0.47931	56.21176 ± 0.62877
7	A	1.46485 ± 0.03116	3.97501 ± 0.04381	4.66694 ± 0.06046
8	Reduced Chi-Sqr	4.43752E-6		
9	R-Square (COD)	0.99255		
10	Adj. R-Square	0.99239		

Figure A1. Détermination du degré d'amidation de la pectine par déconvolution des spectres IR-FT dans la plage 1800 et 1500 cm⁻¹ pour la pectine amidée.

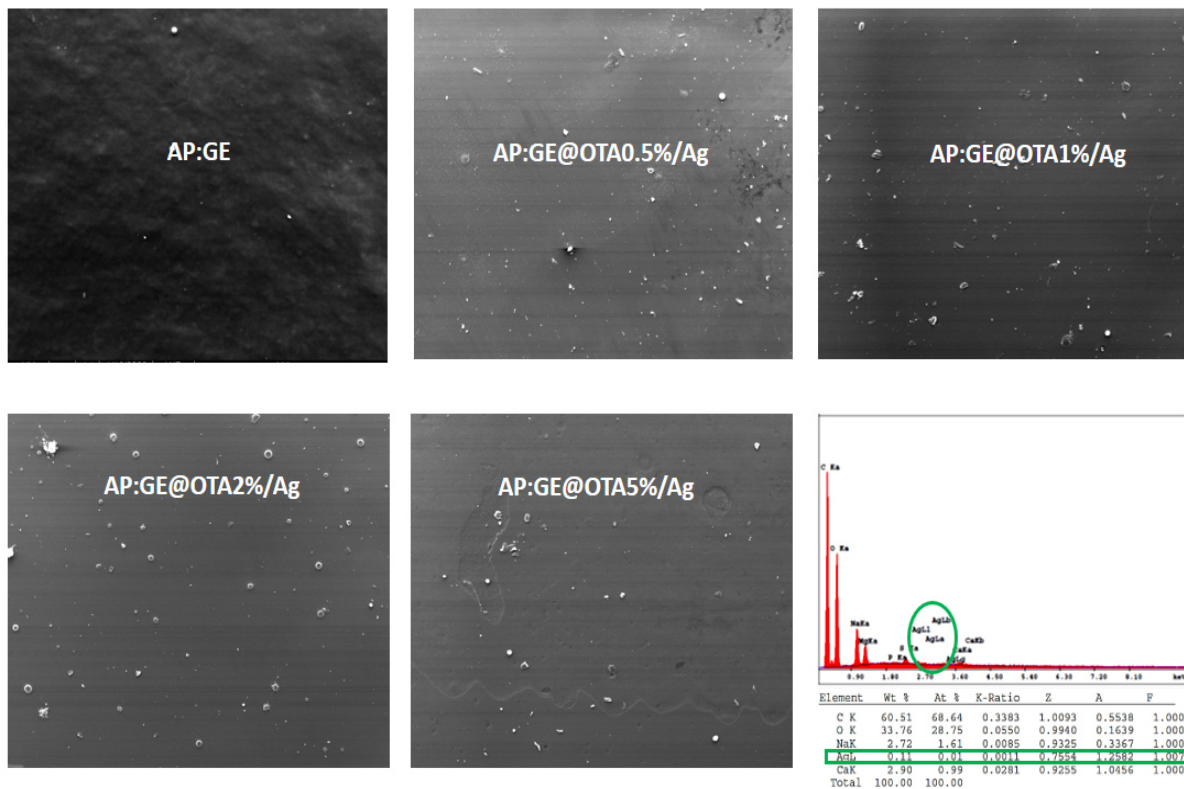


Figure A2. Images MEB des films d'hydrogels nanocomposites élaborés, accompagnées du spectre EDX, mettant en évidence la présence de nanoparticules d'argent.

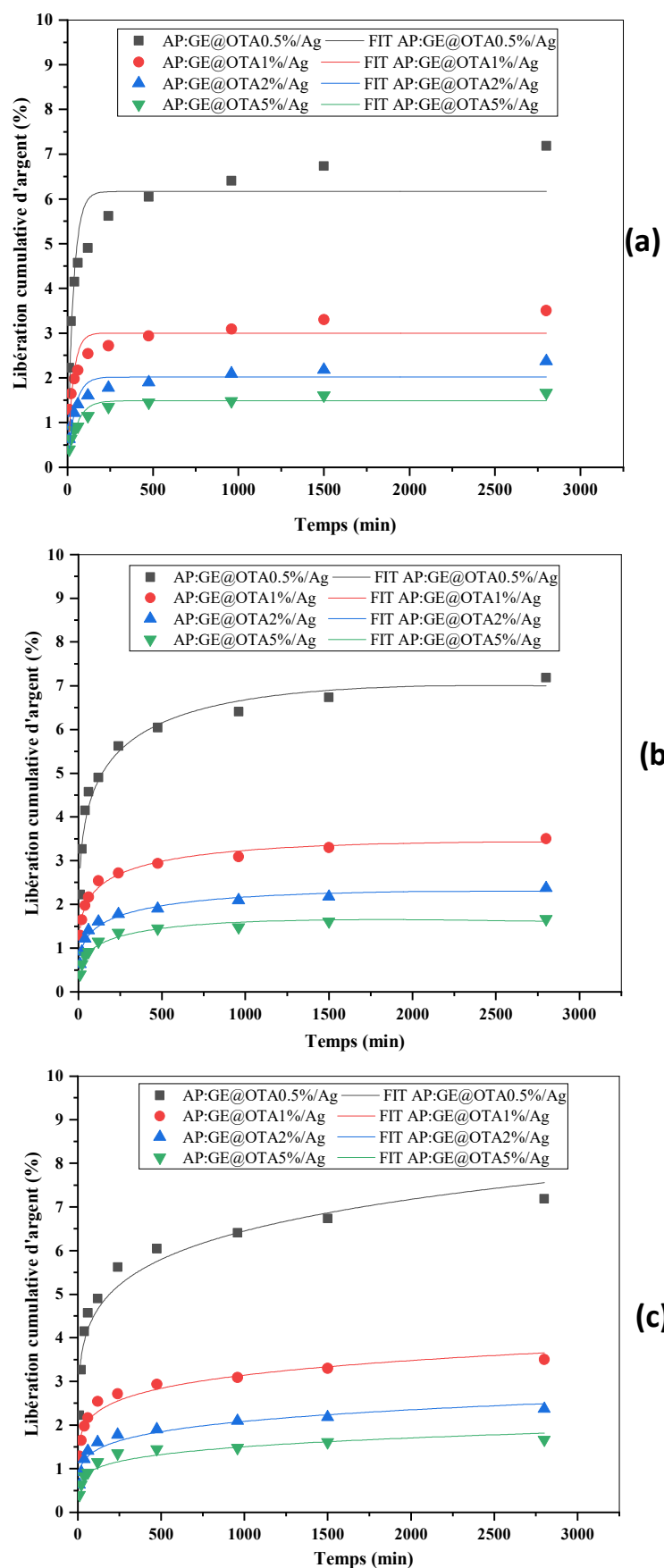


Figure A3 : Courbes d'ajustement des modèles cinétiques de libération d'argent : (a) modèle cinétique de premier ordre ; (b) modèle Sahlin-Peppas ; et (c) modèle Korsmeyer-Peppas.

Fiche technique relative au protocole de préparation des colorants

Préparation du formol 10% :

Paraformaldéhyde	100 ml
Eau distillée.....	900 ml

Préparation des colorants :

Préparation de l'hématoxyline de groat :

Première solution :

Acide sulfurique concentré.....	0.8ml
Eau distillée.....	50ml
Alun de fer.....	1g

Deuxième solution :

Hématoxyline.....	0.5g
Ethanol 95°.....	50ml
Après dissolution par agitation magnétique, les deux solutions sont mélangées, laissées reposer une heure puis filtrées.	

Préparation de l'éosine (sous agitation) :

Eosine.....	1g
Eau distillée.....	100ml

Préparation de la fuchine ponceau :

fuchine acide	0,1g
ponceau.....	0,2g
Eau distillée	300ml
après dissolution ajouter acide acétique.....	0,6ml

Orangé G molybdique :

Orangé G	2g
Eau distillée	100ml
Acide phosphomolybdique	1g

Vert lumière :

Vert lumière	0,1g
Eau distillée	100ml

Préparation de l'eau gélatinée :

Gélatine en poudre	0.4g
Eau distillée.....	100ml

Fiche technique relative au protocole histologique :

Déshydratation et imprégnation à la paraffine :

- 1 bain d'alcool éthylique 70° pendant 30 min
- 1 bain d'alcool éthylique 80° pendant 30 min
- 1 bain d'alcool éthylique 90° pendant 30 min
- 3 bains d'alcool éthylique 100° pendant 30 min (chacun)
- 4 bains de toluène pendant 30 min (chacun)
- 2 bains de paraffine de 2h (chacun) au bain marie à 58°C.

Protocol de coloration à l'hématoxyline-éosine :

- Déparaffinage et réhydratation
- Colorer à l'hématoxyline de Groat pendant 4 min
- Laver à l'eau jusqu'au virage de la coloration au bleu brun
- Colorer pendant 30 secondes à l'éosine
- Rincer à l'eau distillée pendant une minute
- Déshydratation et montage au baume de Canada

Protocol de coloration au trichrome de Masson :

- Déparaffinage, hydratation
- Colorer par l'hématoxyline de Groat pendant 2 à 5 min
- Laver à l'eau courante pendant 5min
- Colorer par le mélange fuchine ponceau pendant 5min
- Rincer à l'eau acétique
- Colorer à l'orangé G molybdique pendant 5min
- Rincer à l'eau acétique
- Colorer au vert lumière pendant 5min
- Laver à l'eau acétique
- Déshydrater et monter

REFERENCES

1. Kamoun, E.A., E.-R.S. Kenawy, and X. Chen, *A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings*. Journal of advanced research, 2017. **8**(3): p. 217-233.
2. Shi, C., et al., *Selection of appropriate wound dressing for various wounds*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2020. **8**: p. 182.
3. Ghobril, C. and M. Grinstaff, *The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial*. Chemical Society Reviews, 2015. **44**(7): p. 1820-1835.
4. Rezvani Ghomi, E., et al., *Wound dressings: Current advances and future directions*. Journal of Applied Polymer Science, 2019. **136**(27): p. 47738.
5. Koehler, J., F.P. Brandl, and A.M. Goepferich, *Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds*. European Polymer Journal, 2018. **100**: p. 1-11.
6. Xiang, J., L. Shen, and Y. Hong, *Status and future scope of hydrogels in wound healing: Synthesis, materials and evaluation*. European Polymer Journal, 2020. **130**: p. 109609.
7. Zhang, C., et al., *Mussel-inspired hydrogels: from design principles to promising applications*. Chemical Society Reviews, 2020. **49**(11): p. 3605-3637.
8. Zhang, L., et al., *A systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness and safety of hydrogel dressings in the management of skin wounds*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2019. **7**: p. 342.
9. Goodwin, N.S., A. Spinks, and J. Wasiak, *The efficacy of hydrogel dressings as a first aid measure for burn wound management in the pre-hospital setting: A systematic review of the literature*. International Wound Journal, 2016. **13**(4): p. 519-525.
10. Hettiaratchi, M.H., et al., *A rapid method for determining protein diffusion through hydrogels for regenerative medicine applications*. APL bioengineering, 2018. **2**(2).
11. Aljghami, M.E., S. Saboor, and S. Amini-Nik, *Emerging innovative wound dressings*. Annals of biomedical engineering, 2019. **47**: p. 659-675.
12. Gupta, A., et al., *The production and application of hydrogels for wound management: A review*. European Polymer Journal, 2019. **111**: p. 134-151.
13. Li, L., et al., *Novel mussel-inspired injectable self-healing hydrogel with anti-biofouling property*. Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.), 2015. **27**(7): p. 1294-1299.
14. Shinde, U.P., B. Yeon, and B. Jeong, *Recent progress of in situ formed gels for biomedical applications*. Progress in polymer science, 2013. **38**(3-4): p. 672-701.
15. Pan, Z., H. Ye, and D. Wu, *Recent advances on polymeric hydrogels as wound dressings*. APL bioengineering, 2021. **5**(1).
16. Bao, X., et al., *Antibacterial and antioxidant films based on HA/Gr/TA fabricated using electrospinning for wound healing*. International Journal of Pharmaceutics, 2022. **626**: p. 122139.
17. Zhu, J., et al., *Smart bioadhesives for wound healing and closure*. Bioactive Materials, 2023. **19**: p. 360-375.
18. Souliotis, K., et al., *A cost and clinical effectiveness analysis among moist wound healing dressings versus traditional methods in home care patients with pressure ulcers*. Wound Repair and Regeneration, 2016. **24**(3): p. 596-601.

19. Gardikiotis, I., et al., *Borrowing the features of biopolymers for emerging Wound Healing Dressings: a review*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(15): p. 8778.
20. Alka, A., et al., *Polymeric Gel Scaffolds and Biomimetic Environments for Wound Healing*. Current Pharmaceutical Design, 2023.
21. Kong, Y., et al., *Degradable tough chitosan dressing for skin wound recovery*. Nanotechnology Reviews, 2020. **9**(1): p. 1576-1585.
22. Yao, H., et al., *Design strategies for adhesive hydrogels with natural antibacterial agents as wound dressings: Status and trends*. Materials Today Bio, 2022: p. 100429.
23. Freitas, C.M.P., et al., *Structure and applications of pectin in food, biomedical, and pharmaceutical industry: A review*. Coatings, 2021. **11**(8): p. 922.
24. Bostancı, N.S., et al., *pH responsive release of curcumin from photocrosslinked pectin/gelatin hydrogel wound dressings*. Biomaterials Advances, 2022. **134**: p. 112717.
25. Osetrov, K., M. Uspenskaya, and V. Sitnikova, *The influence of oxidant on gelatin-tannin hydrogel properties and structure for potential biomedical application*. Polymers, 2021. **14**(1): p. 150.
26. Tummalapalli, M., et al., *Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing*. International journal of pharmaceutics, 2016. **505**(1-2): p. 234-245.
27. Li, T., M. Sun, and S. Wu, *State-of-the-art review of electrospun gelatin-based nanofiber dressings for wound healing applications*. Nanomaterials, 2022. **12**(5): p. 784.
28. Shi, X., et al., *Gelatin-crosslinked pectin nanofiber mats allowing cell infiltration*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **112**: p. 110941.
29. Pujana, M.A., et al., *Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin*. Carbohydrate Polymers, 2013. **94**(2): p. 836-842.
30. Reddy, N., R. Reddy, and Q. Jiang, *Crosslinking biopolymers for biomedical applications*. Trends in biotechnology, 2015. **33**(6): p. 362-369.
31. Guo, Z., et al., *Tannic acid-based metal phenolic networks for bio-applications: a review*. Journal of Materials Chemistry B, 2021. **9**(20): p. 4098-4110.
32. Chariyarangsitham, W., et al., *Effect of advanced oxidation and amino acid addition on antioxidant capability, iron chelating property and anti-cancer activity of tannic acid*. Arabian Journal of Chemistry, 2021. **14**(9): p. 103312.
33. Juby, K., et al., *Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study*. Carbohydrate polymers, 2012. **89**(3): p. 906-913.
34. George, A., et al., *A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites*. International journal of biological macromolecules, 2020. **154**: p. 329-338.
35. Hama, R., et al., *Recent developments in biopolymer-based hydrogels for tissue engineering applications*. Biomolecules, 2023. **13**(2): p. 280.
36. Francis, R., S. Sasikumar, and G.P. Gopalan, *Synthesis, structure, and properties of biopolymers (natural and synthetic)*. Polymer composites, 2013: p. 11-107.
37. Devadas, V.V., et al., *Algae biopolymer towards sustainable circular economy*. Bioresource technology, 2021. **325**: p. 124702.
38. Sharma, V. and P.P. Kundu, *Addition polymers from natural oils—A review*. Progress in polymer science, 2006. **31**(11): p. 983-1008.

39. Jummaat, F., et al., *The role of biopolymer-based materials in obstetrics and gynecology applications: A review*. Polymers, 2021. **13**(4): p. 633.
40. Prameela, K., C.M. Mohan, and C. Ramakrishna, *Biopolymers for food design: consumer-friendly natural ingredients*, in *Biopolymers for food design*. 2018, Elsevier. p. 1-32.
41. Altalhi, T., *Handbook of bioplastics and biocomposites engineering applications*. 2022: John Wiley & Sons.
42. Dintcheva, N.T., et al., *Natural compounds as sustainable additives for biopolymers*. Polymers, 2020. **12**(4): p. 732.
43. Mukherjee, C., et al., *Recent advances in biodegradable polymers—properties, applications and future prospects*. European Polymer Journal, 2023. **192**: p. 112068.
44. Mano, J., et al., *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends*. Journal of the royal society interface, 2007. **4**(17): p. 999-1030.
45. Jurak, M., et al., *What affects the biocompatibility of polymers?* Advances in Colloid and Interface Science, 2021. **294**: p. 102451.
46. Morris, A.H., D. Stamer, and T. Kyriakides. *The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials*. in *Seminars in immunology*. 2017. Elsevier.
47. Suarato, G., R. Bertorelli, and A. Athanassiou, *Borrowing from nature: biopolymers and biocomposites as smart wound care materials*. Bioengineering and Biotechnology, 2018. **6**: p. 137.
48. Rebelo, R., M. Fernandes, and R. Figueiro, *Biopolymers in medical implants: a brief review*. Procedia engineering, 2017. **200**: p. 236-243.
49. Chen, X.-S., *Biomedical Polymers—Escort for Human Health*. Chinese Journal of Polymer Science, 2022. **40**(9): p. 1004.
50. Zhao, D., et al., *Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles*. Polymers, 2018. **10**(4): p. 462.
51. Nie, J., et al., *Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: Mechanisms, methods, and prospects for future research*. Science of the Total Environment, 2020. **707**: p. 136080.
52. Sadasivuni, K.K., et al., *Recent advances in mechanical properties of biopolymer composites: a review*. Polymer Composites, 2020. **41**(1): p. 32-59.
53. Deshmukh, K., et al., *Synergistic effect of vanadium pentoxide and graphene oxide in polyvinyl alcohol for energy storage application*. European Polymer Journal, 2016. **76**: p. 14-27.
54. Thakur, V.K. and M.K. Thakur, *Eco-friendly polymer nanocomposites*. Chemistry and Applications. Springer, 2015. **51**.
55. Udayakumar, G.P., et al., *Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021. **9**(4): p. 105322.
56. Yatigala, N.S., D.S. Bajwa, and S.G. Bajwa, *Compatibilization improves physico-mechanical properties of biodegradable biobased polymer composites*. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2018. **107**: p. 315-325.
57. John, M.J. and S. Thomas, *Biofibres and biocomposites*. Carbohydrate polymers, 2008. **71**(3): p. 343-364.
58. Rebouillat, S. and F. Pla, *Recent strategies for the development of biosourced-monomers, oligomers and polymers-based materials: A review with an innovation*

- and a bigger data focus. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2016. **7**(4): p. 167-213.
59. Weyhrich, C.W., et al., *Renewed interest in biopolymer composites: incorporation of renewable, plant-sourced fibers*. *Green Chemistry*, 2023. **25**(1): p. 106-129.
 60. Sid, S., et al., *Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review*. *Trends in Food Science & Technology*, 2021. **115**: p. 87-104.
 61. Zhang, T., et al., *Disentangling loosening from softening: insights into primary cell wall structure*. *The Plant Journal*, 2019. **100**(6): p. 1101-1117.
 62. Wang, X., L. Wilson, and D.J. Cosgrove, *Pectin methylesterase selectively softens the onion epidermal wall yet reduces acid-induced creep*. *Journal of experimental botany*, 2020. **71**(9): p. 2629-2640.
 63. Vincken, J.-P., et al., *If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture*. *Plant physiology*, 2003. **132**(4): p. 1781-1789.
 64. Del Mundo, J.T., et al., *Grazing-incidence diffraction reveals cellulose and pectin organization in hydrated plant primary cell wall*. *Scientific reports*, 2023. **13**(1): p. 5421.
 65. Vanitha, T. and M. Khan, *Role of pectin in food processing and food packaging. Pectins-extraction, purification, characterization and applications*, 2019. **10**.
 66. Dranca, F., M. Vargas, and M. Oroian, *Physicochemical properties of pectin from *Malus domestica* 'Fălticeni' apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques*. *Food Hydrocolloids*, 2020. **100**: p. 105383.
 67. Guandalini, B.B.V., N.P. Rodrigues, and L.D.F. Marczak, *Sequential extraction of phenolics and pectin from mango peel assisted by ultrasound*. *Food Research International*, 2019. **119**: p. 455-461.
 68. de Oliveira, C.F., et al., *Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound*. *LWT-Food Science and Technology*, 2016. **71**: p. 110-115.
 69. Hosseini, S.S., et al., *Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method*. *International journal of biological macromolecules*, 2019. **125**: p. 621-629.
 70. Xu, S.-Y., et al., *Ultrasonic-microwave assisted extraction, characterization and biological activity of pectin from jackfruit peel*. *Lwt*, 2018. **90**: p. 577-582.
 71. Rahmati, S., A. Abdullah, and O.L. Kang, *Effects of different microwave intensity on the extraction yield and physicochemical properties of pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peels*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2019. **18**: p. 100186.
 72. Su, D.-L., et al., *Efficient extraction and characterization of pectin from orange peel by a combined surfactant and microwave assisted process*. *Food chemistry*, 2019. **286**: p. 1-7.
 73. Grassino, A.N., et al., *Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste*. *Food chemistry*, 2016. **198**: p. 93-100.
 74. Rodsamran, P. and R. Sothornvit, *Microwave heating extraction of pectin from lime peel: Characterization and properties compared with the conventional heating method*. *Food chemistry*, 2019. **278**: p. 364-372.
 75. Bagherian, H., et al., *Comparisons between conventional, microwave-and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit*. *Chemical engineering and processing: Process Intensification*, 2011. **50**(11-12): p. 1237-1243.

76. Sabater, C., et al., *Enzymatic extraction of pectin from artichoke (Cynara scolymus L.) by-products using Celluclast® 1.5 L*. Carbohydrate polymers, 2018. **190**: p. 43-49.
77. Liew, S.Q., et al., *Sequential ultrasound-microwave assisted acid extraction (UMAE) of pectin from pomelo peels*. International journal of biological macromolecules, 2016. **93**: p. 426-435.
78. Vasco-Correa, J. and A.D.Z. Zapata, *Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (Passiflora edulis f. flavicarpa) at laboratory and bench scale*. Lwt, 2017. **80**: p. 280-285.
79. Tran, N.T.K., et al., *Microwave-assisted extraction of pectin from jackfruit rags: Optimization, physicochemical properties and antibacterial activities*. Food Chemistry, 2023. **418**: p. 135807.
80. Liu, J., et al., *Interfacial properties of ultrahigh methoxylated pectin*. International journal of biological macromolecules, 2020. **152**: p. 403-410.
81. Feng, S., et al., *The role of amide groups in the mechanism of acid-induced pectin gelation: A potential pH-sensitive hydrogel based on hydrogen bond interactions*. Food Hydrocolloids, 2023. **141**: p. 108741.
82. Phillips, L., *Pectin chemical properties, uses and health benefits [Himicheskie svoystva, primeneniye i pol'za dlya zdorov'ya pektina]*. 2014, New York: Nova Science Publishers.
83. Wan, L., et al., *Comparative study on gelling properties of low methoxyl pectin prepared by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic, atmospheric enzymatic, and alkaline de-esterification*. Carbohydrate Polymers, 2019. **226**: p. 115285.
84. Li, Y., et al., *pH-responsive Pickering emulsions-pectin hydrogel beads for loading of resveratrol: Preparation, characterization, and evaluation*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023. **79**: p. 104008.
85. Gołębiowski, A., T. Kowalkowski, and B. Buszewski, *Molecular parameters of low methoxylated pectin affected by gelation with copper and cadmium cations*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2020. **21**: p. 100211.
86. Cao, L., et al., *Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review*. Carbohydrate polymers, 2020. **242**: p. 116389.
87. Picot-Allain, M.C.N., B. Ramasawmy, and M.N. Emmambux, *Extraction, characterisation, and application of pectin from tropical and sub-tropical fruits: a review*. Food Reviews International, 2022. **38**(3): p. 282-312.
88. Kontogiorgos, V., *Pectin: technological and physiological properties*. 2020: Springer.
89. Hassan, E.A., et al., *New pectin derivatives with antimicrobial and emulsification properties via complexation with metal-terpyridines*. Carbohydrate Polymers, 2021. **268**: p. 118230.
90. Trejo-González, L., et al., *Antimicrobial pectin-gellan films: effects on three foodborne pathogens in a meat medium, and selected physical-mechanical properties*. CyTA-Journal of Food, 2018. **16**(1): p. 469-476.
91. Lopes, N.A., C.M.B. Pinilla, and A. Brandelli, *Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides*. Food hydrocolloids, 2019. **93**: p. 1-9.
92. Lv, J.M., et al., *Properties of epsilon-polylysine·HCl/high-methoxyl pectin polyelectrolyte complexes and their commercial application*. Journal of Food Processing and Preservation, 2020. **44**(2): p. e14320.

93. Eghbal, N., et al., *Antimicrobial films based on pectin and sodium caseinate for the release of antifungal natamycin*. Journal of Food Processing and Preservation, 2019. **43**(7): p. e13953.
94. Tummalapalli, M., et al., *Composite wound dressings of pectin and gelatin with aloe vera and curcumin as bioactive agents*. International journal of biological macromolecules, 2016. **82**: p. 104-113.
95. Bermúdez-Oria, A., et al., *Physical and functional properties of pectin-fish gelatin films containing the olive phenols hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenylglycol*. Carbohydrate polymers, 2017. **178**: p. 368-377.
96. Lei, Y., et al., *Investigation of the structural and physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of pectin-konjac glucomannan composite edible films incorporated with tea polyphenol*. Food Hydrocolloids, 2019. **94**: p. 128-135.
97. Nisar, T., et al., *Citrus pectin films enriched with thinned young apple polyphenols for potential use as bio-based active packaging*. CyTA-Journal of Food, 2019. **17**(1): p. 695-705.
98. Mellinas, C., et al., *Recent trends in the use of pectin from agro-waste residues as a natural-based biopolymer for food packaging applications*. Materials, 2020. **13**(3): p. 673.
99. Mudarisova, R., et al., *Intermolecular interactions of apple pectin modified by pharmacophores with iodine and antimicrobial activity of iodine-containing pectin materials*. Biointerface Research in Applied Chemistry, 2020. **10**(4): p. 5724-5732.
100. Li, D.-q., et al., *Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review*. International journal of biological macromolecules, 2021. **185**: p. 49-65.
101. Sharma, R. and M. Ahuja, *Thiolated pectin: Synthesis, characterization and evaluation as a mucoadhesive polymer*. Carbohydrate Polymers, 2011. **85**(3): p. 658-663.
102. Vityazev, F., et al., *Synthesis of sulfated pectins and their anticoagulant activity*. Biochemistry (Moscow), 2010. **75**: p. 759-768.
103. Sila, D.N., et al., *Non-enzymatic depolymerization of carrot pectin: toward a better understanding of carrot texture during thermal processing*. Journal of food science, 2006. **71**(1): p. E1-E9.
104. Morris, G.A., et al., *Modification of pectin with UV-absorbing substituents and its effect on the structural and hydrodynamic properties of the water-soluble derivatives*. Carbohydrate polymers, 2002. **48**(4): p. 351-359.
105. Chen, J., et al., *Pectin modifications: a review*. Critical reviews in food science and nutrition, 2015. **55**(12): p. 1684-1698.
106. Li, S., et al., *Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016. **15**(2): p. 237-250.
107. Morris, G., T. Foster, and S. Harding, *The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin*. Food Hydrocolloids, 2000. **14**(3): p. 227-235.
108. Koshy, J. and D. Sangeetha, *Recent progress and treatment strategy of pectin polysaccharide based tissue engineering scaffolds in cancer therapy, wound healing and cartilage regeneration*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023: p. 128594.
109. Basak, S. and U.S. Annapure, *Trends in “green” and novel methods of pectin modification-A review*. Carbohydrate Polymers, 2022. **278**: p. 118967.

110. Phuong, N.T., et al., *Enzyme-mediated fabrication of an oxidized chitosan hydrogel as a tissue sealant*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2015. **30**(4): p. 412-423.
111. Pepelanova, I., et al., *Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting*. Bioengineering, 2018. **5**(3): p. 55.
112. Heck, T., et al., *Enzyme-catalyzed protein crosslinking*. Applied microbiology and biotechnology, 2013. **97**: p. 461-475.
113. Hu, M., et al., *Cell immobilization in gelatin–hydroxyphenylpropionic acid hydrogel fibers*. Biomaterials, 2009. **30**(21): p. 3523-3531.
114. Oryan, A., et al., *Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds*. International journal of biological macromolecules, 2018. **107**: p. 678-688.
115. Amirian, J., et al., *In-situ crosslinked hydrogel based on amidated pectin/oxidized chitosan as potential wound dressing for skin repairing*. Carbohydrate Polymers, 2021. **251**: p. 117005.
116. Janarthanan, G., et al., *3D printable and injectable lactoferrin-loaded carboxymethyl cellulose-glycol chitosan hydrogels for tissue engineering applications*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **113**: p. 111008.
117. Wu, X., et al., *Synergistic therapeutic effects of Schiff's base cross-linked injectable hydrogels for local co-delivery of metformin and 5-fluorouracil in a mouse colon carcinoma model*. Biomaterials, 2016. **75**: p. 148-162.
118. Popović, N., et al., *Dopamine-modified pectin for a Streptomyces cyaneus laccase induced microbeads formation, immobilization, and textile dyes decolorization*. Environmental Technology & Innovation, 2021. **22**: p. 101399.
119. Muhoza, B., S. Xia, and X. Zhang, *Gelatin and high methyl pectin coacervates crosslinked with tannic acid: The characterization, rheological properties, and application for peppermint oil microencapsulation*. Food Hydrocolloids, 2019. **97**: p. 105174.
120. Shan, B.H. and F.G. Wu, *Hydrogel-based growth factor delivery platforms: strategies and recent advances*. Advanced Materials, 2024. **36**(5): p. 2210707.
121. Lavrador, P., V.M. Gaspar, and J.F. Mano, *Stimuli-responsive nanocarriers for delivery of bone therapeutics—Barriers and progresses*. Journal of Controlled Release, 2018. **273**: p. 51-67.
122. Gosecka, M., M. Gosecki, and D. Jaworska-Krych, *Hydrophobized hydrogels: construction strategies, properties, and biomedical applications*. Advanced Functional Materials, 2023. **33**(25): p. 2212302.
123. Bashir, S., et al., *Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications*. Polymers, 2020. **12**(11): p. 2702.
124. Zhao, Y., et al., *Double cross-linked biomimetic hyaluronic acid-based hydrogels with thermo-stimulated self-contraction and tissue adhesiveness for accelerating post-wound closure and wound healing*. Advanced Functional Materials, 2023. **33**(26): p. 2300710.
125. Tianyuan, Z., et al., *A Smart MMP13-Responsive Injectable Hydrogel with Inflammatory Diagnostic Logic and Multiphase Therapeutic Ability to Orchestrate Cartilage Regeneration*. Advanced Functional Materials, 2023. **33**(16): p. 2213019.
126. Zhang, Y., et al., *Hydrogel: A potential therapeutic material for bone tissue engineering*. AIP Advances, 2021. **11**(1).

127. Chen, W., et al., *A Matrix-Metalloproteinase-Responsive Hydrogel System for Modulating the Immune Microenvironment in Myocardial Infarction*. Advanced Materials, 2023. **35**(13): p. 2209041.
128. He, S., et al., *Advances in injectable hydrogel strategies for heart failure treatment*. Advanced Healthcare Materials, 2023. **12**(19): p. 2300029.
129. Yang, X., et al., *Hyaluronic acid-based injectable hydrogels for wound dressing and localized tumor therapy: a review*. Advanced NanoBiomed Research, 2022. **2**(12): p. 2200124.
130. Liu, K., et al., *Research progress on polysaccharide/protein hydrogels: Preparation method, functional property and application as delivery systems for bioactive ingredients*. Food Research International, 2021. **147**: p. 110542.
131. Gul, K., et al., *Recent advances in the structure, synthesis, and applications of natural polymeric hydrogels*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022. **62**(14): p. 3817-3832.
132. Yazdi, M.K., et al., *Hydrogel membranes: A review*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **114**: p. 111023.
133. Borbolla-Jiménez, F.V., et al., *Films for wound healing fabricated using a solvent casting technique*. Pharmaceutics, 2023. **15**(7): p. 1914.
134. Zafar, A., et al., *Carboxymethyl cellulose/gelatin hydrogel films loaded with zinc oxide nanoparticles for sustainable food packaging applications*. Polymers, 2022. **14**(23): p. 5201.
135. Roy, S., et al., *Recent progress in PBAT-based films and food packaging applications: A mini-review*. Food Chemistry, 2024. **437**: p. 137822.
136. Dong, M., et al., *Recent progress in fabrications and applications of functional hydrogel films*. Journal of Polymer Science, 2023. **61**(11): p. 1026-1039.
137. Yu, H.C., et al., *Engineering tough metallosupramolecular hydrogel films with kirigami structures for compliant soft electronics*. Small, 2021. **17**(41): p. 2103836.
138. Li, L., et al., *Development and application of multifunctional films based on modified chitosan/gelatin polyelectrolyte complex for preservation and monitoring*. Food Hydrocolloids, 2024. **147**: p. 109336.
139. Zhang, X.N., Q. Zheng, and Z.L. Wu, *Recent advances in 3D printing of tough hydrogels: A review*. Composites Part B: Engineering, 2022. **238**: p. 109895.
140. Leaw, Z.E., I. Kong, and L.P. Pui, *3D printed corn starch–gelatin film with glycerol and hawthorn berry (Crataegus pinnatifida) extract*. Journal of Food Processing and Preservation, 2021. **45**(9): p. e15752.
141. Kamlow, M.-A., et al., *3D printing of edible hydrogels containing thiamine and their comparison to cast gels*. Food Hydrocolloids, 2021. **116**: p. 106550.
142. Sudheer, S., S. Bandyopadhyay, and R. Bhat, *Sustainable polysaccharide and protein hydrogel-based packaging materials for food products: A review*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023: p. 125845.
143. Ghosh, T., T. Das, and R. Purwar, *Review of electrospun hydrogel nanofiber system: Synthesis, Properties and Applications*. Polymer Engineering & Science, 2021. **61**(7): p. 1887-1911.
144. Liu, Y., et al., *Development of a food packaging antibacterial hydrogel based on gelatin, chitosan, and 3-phenyllactic acid for the shelf-life extension of chilled chicken*. Food Hydrocolloids, 2022. **127**: p. 107546.
145. Zhang, C., et al., *Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020. **19**(2): p. 479-502.

146. Park, S.H., et al., *An injectable click-crosslinked hyaluronic acid hydrogel modified with a BMP-2 mimetic peptide as a bone tissue engineering scaffold*. Acta Biomaterialia, 2020. **117**: p. 108-120.
147. Katyal, P., F. Mahmoudinobar, and J.K. Montclare, *Recent trends in peptide and protein-based hydrogels*. Current Opinion in Structural Biology, 2020. **63**: p. 97-105.
148. Chetouani, A., et al., *Multifunctional hydrogels based on oxidized pectin and gelatin for wound healing improvement*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **212**: p. 248-256.
149. Sarioglu, E., et al., *Theophylline-loaded pectin-based hydrogels. II. Effect of concentration of initial pectin solution, crosslinker type and cation concentration of external solution on drug release profile*. Journal of Applied Polymer Science, 2019. **136**(43): p. 48155.
150. Said, N.S., I.F. Olawuyi, and W.Y. Lee, *Pectin hydrogels: Gel-forming behaviors, mechanisms, and food applications*. Gels, 2023. **9**(9): p. 732.
151. Han, S.S., et al., *Pectin based hydrogels for drug delivery applications: a mini review*. Gels, 2022. **8**(12): p. 834.
152. Li, N., et al., *Fabrication and characterization of pectin hydrogel nanofiber scaffolds for differentiation of mesenchymal stem cells into vascular cells*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2019. **5**(12): p. 6511-6519.
153. Chen, W., et al., *A composite hydrogel based on pectin/cellulose via chemical cross-linking for hemorrhage*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. **8**: p. 627351.
154. Thakur, S., et al., *Progress in pectin based hydrogels for water purification: Trends and challenges*. Journal of environmental management, 2019. **238**: p. 210-223.
155. Morello, G., et al., *A thermo-sensitive chitosan/pectin hydrogel for long-term tumor spheroid culture*. Carbohydrate Polymers, 2021. **274**: p. 118633.
156. Long, J., et al., *A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery*. Materials Science and Engineering: C, 2019. **104**: p. 109873.
157. Li, D.-q., et al., *Fabrication of self-healing pectin/chitosan hybrid hydrogel via Diels-Alder reactions for drug delivery with high swelling property, pH-responsiveness, and cytocompatibility*. Carbohydrate Polymers, 2021. **268**: p. 118244.
158. Catori, D.M., et al., *Development of composite hydrogel based on hydroxyapatite mineralization over pectin reinforced with cellulose nanocrystal*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **167**: p. 726-735.
159. Phonrachom, O., et al., *Potential use of propolis-loaded quaternized chitosan/pectin hydrogel films as wound dressings: Preparation, characterization, antibacterial evaluation, and in vitro healing assay*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **241**: p. 124633.
160. Chanmontri, M., et al., *Physicochemical and in vitro biological evaluation of an injectable self-healing quaternized chitosan/oxidized pectin hydrogel for potential use as a wound dressing material*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **242**: p. 124984.
161. Goel, H., et al., *Bioactivity reinforced surface patch bound collagen-pectin hydrogel*. International journal of biological macromolecules, 2021. **174**: p. 240-253.

162. Clifford, A., et al., *Electrochemical fabrication and characterization of pectin hydrogel composite materials for bone tissue repair*. ACS Applied Polymer Materials, 2020. **2**(8): p. 3390-3396.
163. Campiglio, C.E., A. Carcano, and L. Draghi, *RGD-pectin microfiber patches for guiding muscle tissue regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2022. **110**(3): p. 515-524.
164. Bhuyan, M.M., et al., *Synthesis of pectin-N, N-dimethyl acrylamide hydrogel by gamma radiation and application in drug delivery (in vitro)*. Journal of Macromolecular Science, Part A, 2018. **55**(4): p. 369-376.
165. Ahadi, F., S. Khorshidi, and A. Karkhaneh, *A hydrogel/fiber scaffold based on silk fibroin/oxidized pectin with sustainable release of vancomycin hydrochloride*. European Polymer Journal, 2019. **118**: p. 265-274.
166. Nejati, S., et al., *Development of an oxygen-releasing electroconductive in-situ crosslinkable hydrogel based on oxidized pectin and grafted gelatin for tissue engineering applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020. **196**: p. 111347.
167. Fares, M.M., et al., *Interpenetrating network gelatin methacryloyl (GelMA) and pectin-g-PCL hydrogels with tunable properties for tissue engineering*. Biomaterials science, 2018. **6**(11): p. 2938-2950.
168. Wang, J.-H., et al., *An injectable, dual crosslinkable hybrid pectin methacrylate (PECMA)/gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogel for skin hemostasis applications*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **185**: p. 441-450.
169. Oh, G.W., et al., *Preparation and properties of physically cross-linked PVA/pectin hydrogels blended at different ratios for wound dressings*. Journal of Applied Polymer Science, 2022. **139**(9): p. 51696.
170. Maalej, H., et al., *A novel pectic polysaccharide-based hydrogel derived from okra (Abelmoschus esculentus L. Moench) for chronic diabetic wound healing*. European Polymer Journal, 2023. **183**: p. 111763.
171. An, H., et al., *Pectin-based injectable and biodegradable self-healing hydrogels for enhanced synergistic anticancer therapy*. Acta Biomaterialia, 2021. **131**: p. 149-161.
172. Zhang, W., et al., *Novel pectin based composite hydrogel derived from grapefruit peel for enhanced Cu (II) removal*. Journal of hazardous materials, 2020. **384**: p. 121445.
173. Alsakhawy, M.A., et al., *Naringin-loaded Arabic gum/pectin hydrogel as a potential wound healing material*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **222**: p. 701-714.
174. Rezvanian, M., et al., *In-vivo evaluation of Alginate-Pectin hydrogel film loaded with Simvastatin for diabetic wound healing in Streptozotocin-induced diabetic rats*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **171**: p. 308-319.
175. Kocaaga, B., F.S. Guner, and O. Kurkcuoglu, *Molecular dynamics simulations can predict the optimum drug loading amount in pectin hydrogels for controlled release*. Materials Today Communications, 2022. **31**: p. 103268.
176. Hafeez, S., et al., *Fabrication of pectin-based stimuli responsive hydrogel for the controlled release of ceftriaxone*. Chemical Papers, 2023. **77**(4): p. 1809-1819.
177. Zafar, N., et al., *Novel Natrosol/Pectin-co-poly (acrylate) based pH-responsive polymeric carrier system for controlled delivery of Tapentadol Hydrochloride*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2023. **31**(8): p. 101671.

178. Islam, F., et al., *Pectin and mucin modified cellulose-based superabsorbent hydrogel for controlled curcumin release*. Cellulose, 2022. **29**(9): p. 5207-5222.
179. Wang, S.-y., et al., *Acylylhydrazone-derived whole pectin-based hydrogel as an injectable drug delivery system*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **251**: p. 126276.
180. Yin, L., et al., *Biodegradable hydrogel from pectin and carboxymethyl cellulose with Silibinin loading for lung tumor therapy*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **243**: p. 125128.
181. Mongkolkitikul, S., N. Paradee, and A. Sirivat, *Electrically controlled release of ibuprofen from conductive poly (3-methoxydiphenylamine)/crosslinked pectin hydrogel*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **112**: p. 20-27.
182. Bu, K., et al., *Encapsulation and sustained release of curcumin by hawthorn pectin and Tenebrio Molitor protein composite hydrogel*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **222**: p. 251-261.
183. Kim, N.-G., et al., *Fabrication and characterization of ferric ion cross-linked hyaluronic acid/pectin-based injectable hydrogel with antibacterial ability*. Polymer, 2023. **271**: p. 125808.
184. Aslam, A., et al., *Green synthesis of quince/pectin cross-linked superporous hydrogel sponges for pH-regulated sustained domperidone delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2023. **644**: p. 123305.
185. Krathumkhet, N., T. Imae, and N. Paradee, *Electrically controlled transdermal ibuprofen delivery consisting of pectin-bacterial cellulose/polypyrrole hydrogel composites*. Cellulose, 2021. **28**: p. 11451-11463.
186. Martínez, Y.N., et al., *Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment*. Bioresource technology, 2013. **145**: p. 280-284.
187. Das, S., *Pectin based multi-particulate carriers for colon-specific delivery of therapeutic agents*. International Journal of Pharmaceutics, 2021. **605**: p. 120814.
188. Wu, B., et al., *Encapsulation of resveratrol-loaded Pickering emulsions in alginate/pectin hydrogel beads: Improved stability and modification of digestive behavior in the gastrointestinal tract*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **222**: p. 337-347.
189. Pandey, M., et al., *Budesonide-loaded pectin/polyacrylamide hydrogel for sustained delivery: Fabrication, characterization and in vitro release kinetics*. Molecules, 2021. **26**(9): p. 2704.
190. Mala, T. and A.K. Anal, *Protection and controlled gastrointestinal release of bromelain by encapsulating in pectin-resistant starch based hydrogel beads*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. **9**: p. 757176.
191. Giusto, G., et al., *A new, easy-to-make pectin-honey hydrogel enhances wound healing in rats*. BMC complementary and alternative medicine, 2017. **17**: p. 1-7.
192. Chen, Y., et al., *Mussel-inspired self-healing hydrogel form pectin and cellulose for hemostasis and diabetic wound repairing*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **246**: p. 125644.
193. Zhao, H., et al., *Engineering pH responsive carboxyethyl chitosan and oxidized pectin-based hydrogels with self-healing, biodegradable and antibacterial properties for wound healing*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **253**: p. 127364.
194. Cheewatanakornkool, K., et al., *Characterization and in vitro release studies of oral microbeads containing thiolated pectin-doxorubicin conjugates for*

- colorectal cancer treatment*. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 2017. **12**(6): p. 509-520.
195. Cheewatanakornkool, K., et al., *Redox-responsive microbeads containing thiolated pectin-doxorubicin conjugate inhibit tumor growth and metastasis: An in vitro and in vivo study*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018. **545**(1-2): p. 1-9.
 196. Kesharwani, P., et al., *Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021. **66**: p. 102914.
 197. Gomez-Florit, M., et al., *Natural-based hydrogels for tissue engineering applications*. *Molecules*, 2020. **25**(24): p. 5858.
 198. Ngadimin, K.D., et al., *Biomimetic hydrogels designed for cartilage tissue engineering*. *Biomaterials science*, 2021. **9**(12): p. 4246-4259.
 199. Lapomarda, A., et al., *Pectin-based scaffolds for tissue engineering applications*, in *Pectins-The New-Old Polysaccharides*. 2021, IntechOpen.
 200. Tortorella, S., et al., *Biocompatible pectin-based hybrid hydrogels for tissue engineering applications*. *New Journal of Chemistry*, 2021. **45**(47): p. 22386-22395.
 201. Zhao, Y., et al., *Supramolecular adhesive hydrogels for tissue engineering applications*. *Chemical Reviews*, 2022. **122**(6): p. 5604-5640.
 202. Asadi, N., et al., *Nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering: a review*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 2018. **46**(3): p. 465-471.
 203. Huang, J., et al., *Advanced nanocomposite hydrogels for cartilage tissue engineering*. *Gels*, 2022. **8**(2): p. 138.
 204. Reitsma, J., J. Thibault, and W. Pilnik, *Properties of amidated pectins. I. Preparation and characterization of amidated pectins and amidated pectic acids*. *Food Hydrocolloids*, 1986. **1**(2): p. 121-127.
 205. Osetrov, K., M. Uspenskaya, and V. Sitnikova, *The influence of oxidant on gelatin–tannin hydrogel properties and structure for potential biomedical application*. *Polymers*, 2022. **14**(1): p. 150.
 206. Alvarez, O.M., *Three step wound treatment method and dressing therefor*. 1989, Google Patents.
 207. Xu, N., et al., *Multifunctional chitosan/gelatin@ tannic acid cryogels decorated with in situ reduced silver nanoparticles for wound healing*. *Burns & Trauma*, 2022. **10**: p. tkac019.
 208. Sinitsya, A., et al., *Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines*. *Carbohydrate polymers*, 2000. **42**(4): p. 359-368.
 209. Xu, C., et al., *Ultrahigh pressure field: A friendly pathway for regulating the cellular adhesion and migration capacity of collagen*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024. **257**: p. 127864.
 210. Grover, C.N., et al., *Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films*. *Acta biomaterialia*, 2012. **8**(8): p. 3080-3090.
 211. Properties, A.S.D.o.M. *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. 1995. American Society for Testing and Materials.
 212. Balakrishnan, B., et al., *Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin*. *Biomaterials*, 2005. **26**(32): p. 6335-6342.
 213. ASTM, A., *Standard E96–00. Standard test methods for water vapour transmission of materials*. *Annual Book of ASTM Standards*, 2000. **4**.

214. Kim, S., et al., *Engineered polymers for advanced drug delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **71**(3): p. 420-430.
215. Peerapattana, J., et al., *Pregelatinized glutinous rice starch as a sustained release agent for tablet preparations*. Carbohydrate Polymers, 2010. **80**(2): p. 453-459.
216. Jost, L., J. Kirkwood, and T. Whiteside, *Improved short-and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells*. Journal of immunological methods, 1992. **147**(2): p. 153-165.
217. Singh, P., et al., *Preparation of thyme oil loaded κ -carrageenan-polyethylene glycol hydrogel membranes as wound care system*. International Journal of Pharmaceutics, 2022. **618**: p. 121661.
218. Sharma, A., et al., *Silver nanoparticle-embedded nanogels for infection-resistant surfaces*. ACS Applied Nano Materials, 2022. **5**(6): p. 8546-8556.
219. Wang, S., et al., *Electrospun laponite-doped poly (lactic-co-glycolic acid) nanofibers for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(44): p. 23357-23367.
220. Wang, Q.Z., et al., *Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. **19**: p. 1371-1377.
221. Khodja, A.N., et al., *Evaluation of healing activity of PVA/chitosan hydrogels on deep second degree burn: pharmacological and toxicological tests*. Burns, 2013. **39**(1): p. 98-104.
222. Berardesca, E. and F. Distanto, *The modulation of skin irritation*. Contact dermatitis, 1994. **31**(5): p. 281-287.
223. Mishra, R.K., et al., *Preparation and characterization of amidated pectin based hydrogels for drug delivery system*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. **19**: p. 2275-2280.
224. Gong, J.-L., et al., *Copper (II) removal by pectin-iron oxide magnetic nanocomposite adsorbent*. Chemical Engineering Journal, 2012. **185**: p. 100-107.
225. Li, C., et al., *Amide pectin: A carrier material for colon-targeted controlled drug release*. Journal of Applied Polymer Science, 2016. **133**(29).
226. Zhuang, Y., et al., *Preparation of functionalized pectin through acylation with alkyl gallates: Experiments coupled with density functional theory*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **202**: p. 278-285.
227. Bubnis, W.A. and C.M. Ofner III, *The determination of ϵ -amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid*. Analytical biochemistry, 1992. **207**(1): p. 129-133.
228. Ofner, I., Clyde M and W.A. Bubnis, *Chemical and swelling evaluations of amino group crosslinking in gelatin and modified gelatin matrices*. Pharmaceutical research, 1996. **13**: p. 1821-1827.
229. Sashidhar, R., A. Capoor, and D. Ramana, *Quantitation of ϵ -amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid: A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio*. Journal of Immunological Methods, 1994. **167**(1-2): p. 121-127.
230. Yang, J., et al., *Double cross-linked chitosan composite films developed with oxidized tannic acid and ferric ions exhibit high strength and excellent water resistance*. Biomacromolecules, 2019. **20**(2): p. 801-812.
231. Hoque, M.S., S. Benjakul, and T. Prodpran, *Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin*. Journal of Food Engineering, 2010. **96**(1): p. 66-73.

232. Chetouani, A., et al., *Synthesis and properties of novel hydrogels from oxidized pectin crosslinked gelatin for biomedical applications*. Polymer Bulletin, 2014. **71**: p. 2303-2316.
233. Xu, G., et al., *Multifunctional chitosan/silver/tannic acid cryogels for hemostasis and wound healing*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **208**: p. 760-771.
234. Alves-Silva, G.F., V.P. Romani, and V.G. Martins, *Different crosslinking as a strategy to improve films produced from external mesocarp of pequi (Caryocar brasiliense)*. Food Chemistry, 2024. **432**: p. 137202.
235. Ki, C.S., et al., *Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution*. Polymer, 2005. **46**(14): p. 5094-5102.
236. Mishra, R., A. Majeed, and A. Banthia, *Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing*. International Journal of Plastics Technology, 2011. **15**: p. 82-95.
237. Bigi, A., S. Panzavolta, and K. Rubini, *Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films*. Biomaterials, 2004. **25**(25): p. 5675-5680.
238. Peña, C., et al., *Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition*. Bioresource technology, 2010. **101**(17): p. 6836-6842.
239. Nguyen, N.-T. and J.-H. Liu, *A green method for in situ synthesis of poly (vinyl alcohol)/chitosan hydrogel thin films with entrapped silver nanoparticles*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2014. **45**(5): p. 2827-2833.
240. Ha, M.K., Y.J. Shim, and T.H. Yoon, *Effects of agglomeration on in vitro dosimetry and cellular association of silver nanoparticles*. Environmental Science: Nano, 2018. **5**(2): p. 446-455.
241. Hirschle, P., et al., *Exploration of MOF nanoparticle sizes using various physical characterization methods—is what you measure what you get?* CrystEngComm, 2016. **18**(23): p. 4359-4368.
242. Ding, Z., et al., *Charging effect induced by electron beam irradiation: a review*. Science and Technology of Advanced Materials, 2021. **22**(1): p. 932-971.
243. Chebakova, K.A., et al., *X-ray fluorescence spectroscopy features of micro-and nanoscale copper and nickel particle compositions*. Nanomaterials, 2021. **11**(9): p. 2388.
244. Fan, H., et al., *Supramolecular hydrogel formation based on tannic acid*. Macromolecules, 2017. **50**(2): p. 666-676.
245. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*. Journal of advanced research, 2015. **6**(2): p. 105-121.
246. Saharudin, M.S., et al., *The degradation of mechanical properties in polymer nano-composites exposed to liquid media—a review*. RSC advances, 2016. **6**(2): p. 1076-1089.
247. Queen, D., et al., *The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings*. Biomaterials, 1987. **8**(5): p. 367-371.
248. Pangli, H., et al., *Incorporation of silver nanoparticles in hydrogel matrices for controlling wound infection*. Journal of Burn Care & Research, 2021. **42**(4): p. 785-793.
249. Gonçalves, S.M., et al., *Structure and functional properties of cellulose acetate films incorporated with glycerol*. Carbohydrate polymers, 2019. **209**: p. 190-197.
250. Chen, C., et al., *Tannic acid: A crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: A review*. RSC advances, 2022. **12**(13): p. 7689-7711.

251. Ou, S., et al., *Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate*. Journal of food engineering, 2005. **70**(2): p. 205-210.
252. Wang, L., C. Hu, and L. Shao, *The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future*. International journal of nanomedicine, 2017: p. 1227-1249.
253. Hebeish, A., et al., *Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles*. International journal of biological macromolecules, 2014. **65**: p. 509-515.
254. Lubick, N., *Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both?* 2008, ACS Publications.
255. Sotiriou, G.A. and S.E. Pratsinis, *Antibacterial activity of nanosilver ions and particles*. Environmental science & technology, 2010. **44**(14): p. 5649-5654.
256. Rigo, C., et al., *Characterization and evaluation of silver release from four different dressings used in burns care*. Burns, 2012. **38**(8): p. 1131-1142.
257. Silva, F.M., et al., *Cationic release behaviour of antimicrobial cellulose/silver nanocomposites*. Cellulose, 2014. **21**: p. 3551-3560.
258. Shahravan, A. and T. Matsoukas, *Encapsulation and controlled release from core-shell nanoparticles fabricated by plasma polymerization*. Journal of Nanoparticle Research, 2012. **14**: p. 1-11.
259. Kishore, K., et al., *Pectin encapsulated novel nanocomposite augments wound healing in Sprague Dawley rats*. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2023. **6**: p. 100370.
260. Boakye, Y.D., C. Agyare, and A. Hensel, *Anti-infective properties and time-kill kinetics of Phyllanthus muellerianus and its major constituent, geraniin*. 2016.
261. Chung, K.-T., Z. Lu, and M. Chou, *Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria*. Food and Chemical Toxicology, 1998. **36**(12): p. 1053-1060.
262. Shahverdi, A.R., et al., *Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2007. **3**(2): p. 168-171.
263. Morones, J.R., et al., *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. Nanotechnology, 2005. **16**(10): p. 2346.
264. Yu, Y., et al., *Preparation of multifunctional poly (l-lactic acid) film using heparin-mimetic polysaccharide multilayers: Hemocompatibility, cytotoxicity, antibacterial and drug loading/releasing properties*. International journal of biological macromolecules, 2020. **155**: p. 14-26.
265. Chen, Y., et al., *Preparation of porous carboxymethyl chitosan grafted poly (acrylic acid) superabsorbent by solvent precipitation and its application as a hemostatic wound dressing*. Materials Science and Engineering: C, 2016. **63**: p. 18-29.
266. Meena, L.K., et al., *Study of locust bean gum reinforced cyst-chitosan and oxidized dextran based semi-IPN cryogel dressing for hemostatic application*. Bioactive Materials, 2018. **3**(3): p. 370-384.
267. Wen, J., et al., *Reversible hemostatic properties of sulfobetaine/quaternary ammonium modified hyperbranched polyglycerol*. Biomaterials, 2016. **86**: p. 42-55.
268. Reinke, J. and H. Sorg, *Wound repair and regeneration*. European surgical research, 2012. **49**(1): p. 35-43.

269. Birch, N.P., et al., *Thermal-responsive behavior of a cell compatible chitosan/pectin hydrogel*. *Biomacromolecules*, 2015. **16**(6): p. 1837-1843.
270. Alhajj, M. and A. Goyal, *Physiology, Granulation Tissue*. [Updated 2021 Oct 30]. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
271. Santos, T.S., et al., *Histological evidence of wound healing improvement in rats treated with oral administration of hydroalcoholic extract of vitis labrusca*. *Current issues in molecular biology*, 2021. **43**(1): p. 335-352.