

RÉMI PARENTEAU BAREIL

**PRÉPARATION D'UN SUBSTITUT DERMIQUE DE COLLAGÈNE ET DE
CHITOSANE : ÉTUDE COMPARATIVE SUR L'UTILISATION DES
COLLAGÈNES BOVIN, PORCIN ET AVIAIRE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

RÉSUMÉ

Lors de cette étude, le potentiel des collagènes porcine et aviaire pour la fabrication d'un biomatériau à base de collagène et de chitosane a été évalué. L'utilisation de ces collagènes a été comparée à celle du collagène bovin, utilisé dans notre laboratoire depuis plusieurs années, pour la fabrication de ce biomatériau. Ce dernier, produit sous forme d'éponge, sert principalement de substitut dermique expérimental, mais pourrait éventuellement devenir un substitut dermique pour des applications cliniques.

Nous avons pu démontrer que les collagènes porcine et aviaire pouvaient être utilisés comme alternatives au collagène bovin pour la production de biomatériaux pour ce qui est des paramètres de colonisation cellulaire, des propriétés mécaniques et de la cytotoxicité. Il nous est apparu évident que le changement de source de collagène nécessitait l'optimisation des ratios de collagène et de chitosane ainsi que des paramètres de lyophilisation afin de moduler la taille des pores des éponges produites.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the potential of porcine and avian collagen in the production of a biomaterial combining collagen and chitosan. The biomaterials produced with these types of collagen were compared with a bovine collagen-based biomaterial normally used in our laboratory. This biomaterial is commonly used as a dermal equivalent for *in vitro* and *in vivo* studies.

In this experiment, we have shown that porcine and avian collagen can be used as an alternative to bovine collagen in the production of our collagen-chitosan biomaterial. The resulting biomaterials showed similar characteristics for cell colonisation, tensile strength and cytotoxicity. Nonetheless, it seems obvious that some fine-tuning needs to be done concerning the collagen-chitosan ratio and the freeze-drying parameters to achieve a uniform pore sizes and distribution throughout the entire produced biomaterial from each collagen sources.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche le Dr François Berthod pour m'avoir laissé faire mes preuves au sein de son équipe, et ce, avec autant de liberté. Je tiens aussi à citer les Drs François A. Auger et Lucie Germain, car sans l'infrastructure du LOEX qu'ils ont créée, je n'aurais pu commencer et poursuivre mes études graduées dans ce laboratoire si unique.

Il est très important pour moi de souligner le nom de mes paires et séniors qui ont été des modèles chacun à leur manière. Dre Marie Gingras qui a été mon pilier à mes tous débuts dans l'équipe Neuro. Caroline Auclair-Daigle, qui en plus d'être une très bonne amie, m'a montré que si l'on assume son originalité "the sky is the limit". Robert "aka Bob" J. Gauvin qui est devenu un ami, mais qui a toujours été et sera toujours un mentor pour moi. Merci de m'avoir montré la voie du Jedi. Marie-Christine Fiola qui a toujours été là pour moi, et qui j'espère ne sera jamais bien loin. Caroline Vincent qui a été une oreille attentive et une chambreuse furtive. Mes autres collègues et amis du LOEX : Todd, Rosa, Johnny, Saïda, Max, Pat, Jean-Michel, Peter, Guillaume, Olivier et tous les autres que j'oublie et avec qui j'ai eu et j'espère avoir encore beaucoup de plaisir au travail comme dans les loisirs.

Finalement, je tiens à remercier ma famille. Premièrement, mes parents sans qui je n'en serais pas là car ils m'ont fabriqué, aimé et transmis la soif du savoir (sans mentionner le soutien financier, merci Pa). Deuxièmement, ma douce moitié sans qui je ne serais pas ici. Merci Anne, mon amour, de toujours m'endurer, d'être là pour moi et de m'aimer malgré tous mes défauts (ce qui comprend le fait d'être étudiant et pauvre). Troisièmement, merci à mon frère et ma sœur qui ont toujours cru en moi et pris soin de moi sans considération de distance.

Pour terminer, j'aimerais faire un clin d'œil tout particulier à Minuit qui, même avant l'obtention de mon grade, a toujours agi avec moi comme si j'étais un Maître, son seul et unique Maître.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Abstract.....	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures et des tableaux	vii
Liste des abréviations	xi
 Chapitre I - Introduction	 1
1.1 La peau	2
1.1.1 L'épiderme.....	3
1.1.2 Le derme	4
1.2 Les lésions cutanées	6
1.2.1 Les types de brûlures	6
1.2.2 La réaction corporelle aux brûlures	7
1.2.3 Le processus de guérison d'une lésion cutanée	9
1.3 Les types de recouvrement.....	10
1.3.1 Les méthodes temporaires de recouvrement.....	11
1.3.2 Les méthodes permanentes de recouvrement	12
1.3.3 Les types de greffes	14
1.4 Le collagène	15

1.4.1 Biosynthèse et structure	15
1.4.2 Immunogénicité et antigénicité.....	20
1.4.3 Méthodes d'extraction	22
1.4.4 Les biomatériaux à base de collagène	24
1.5 Le chitosane.....	26
1.5.1 Historique	26
1.5.2 Méthodes d'extraction	28
1.5.3 Biodégradation, biocompatibilité et biofonctionnalité	33
Chapitre II - Problématique.....	35
La problématique du collagène bovin et l'origine de cette étude.....	36
Chapitre III - Matériel & Méthodes	38
3.1 Isolement de fibroblastes dermiques humains.....	39
3.2 Production des éponges de collagène-chitosane	40
3.3 Ensemencement et culture des éponges	43
3.4 Immunofluorescence afin de visualiser la MEC produite	43
3.5 Analyse par microscopie électronique à balayage	44
3.6 Détermination de l'activité des métalloprotéinases.....	45
3.7 Détermination du taux de mortalité cellulaire.....	45
3.8 Tests mécaniques.....	45
Analyses Statistiques.....	47

Chapitre IV - Résultats.....	48
Avant-Propos.....	49
4.1 Aspect macroscopique des collagènes selon leur source	50
4.2 Aspect microscopique et caractérisation des pores	51
4.3 Les tests mécaniques	53
4.4 La colonisation cellulaire	56
4.5 L'activité des métalloprotéinases (MMP).....	59
4.6 La cytotoxicité des différents collagènes	61
Chapitre V - Discussion	64
5.1 Aspect macroscopique des collagènes selon leur source	65
5.2 Aspect microscopique et caractérisation des pores	65
5.3 Les tests mécaniques	67
5.4 La colonisation cellulaire	68
5.5 L'activité des MMP.....	69
5.6 La cytotoxicité des différents collagènes	70
Conclusion	71
Annexe I.....	73
Bibliographie.....	74

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1: La peau normale humaine (modifiée de (Geras 1990)).	2
Figure 2: Les couches épidermiques (tirée de http://iupucbio2.iupui.edu/anatomy/images/Chapt04/FG04_03.jpg).	4
Figure 3: Les couches dermiques (tirée de http://iupucbio2.iupui.edu/anatomy/images/Chapt04/FG04_07.jpg).	5
Figure 4: Les types de brûlures (François Berthod, LOEX).	7
Figure 5: Les zones de brûlures (tirée de (Hettiaratchy and Dziewulski 2004)).	8
Figure 6: Vue macroscopique (A) et microscopique (B) du recouvrement temporaire Matriderm™ (modifiée de http://www.skin-healthcare.de).	12
Figure 7: Procédé d'auto-assemblage du LOEX consistant en la superposition de trois feuilletts de fibroblastes subséquentementensemencée avec des kératinocytes (Alexandre Deschambaud, LOEX).	13
Figure 8: Types de greffes de peau pouvant être prélevées : pleine épaisseur ou FTSG (A), mince ou STSG (B) et en filet ou mesh-graft (C) (modifiée de http://www.clarian.org/ADAM/doc/WomenCenter/3/100098.htm et http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19083.htm).	14
Figure 9: Types de mesher pouvant être utilisés soit avec un support amovible déterminant le ratio (A) ou avec un ratio fixe (B) (modifiée de (Taghizadeh and Gilbert 2008)).	15
Figure 10: Structure du collagène à différentes échelles : composition en acides aminés (A), représentation atomique compacte (B), molécule de tropocollagène (triple hélice de chaîne α) (C), représentation structurale d'une fibre de collagène (D) et image de microscopie électronique à transmission (E) (modifiée de http://web.mit.edu/3.082/www/team1_f02/collagen.htm).	16

Figure 11: Diagramme d'assemblage du collagène en neuf étapes, de la synthèse peptidique à la formation des fibres de collagène (modifiée de (Alberts, Johnson et al. 2002)).	19
Figure 12: Classification des déterminants antigéniques du collagène (tirée de (Furthmayr and Timpl 1976)).	21
Figure 13: Visualisation de la formule chimique de la chitine (A) et du chitosane (B) (modifiée de http://www.altakitin.com/).	27
Figure 14: Diagramme d'extraction de la chitine des carapaces de crustacés.	29
Figure 15: Diagramme d'extraction du chitosane à partir de <i>Mucor rouxii</i> (modifiée de (Synowiecki and Al-Khateeb 1997)).	31
Figure 16: Schéma de préparation du biopolymère de collagène et de chitosane avec les trois sources de collagène soit : bovin (B), porcine (P) et aviaire (A).	41
Figure 17: Visualisation de la structure microscopique (A) et macroscopique (B) du biomatériau de collagène et de chitosane.	42
Figure 18: Procédure de stérilisation des éponges et processus expérimental.	42
Figure 19: Aspect macroscopique des collagènes bovin (A), porcine (B) et aviaire (C) après solubilisation dans l'acide acétique 0,1% à une concentration d'environ 1,3 % (m/v).	50
Figure 20: Apparence microscopique des pores des éponges selon la source de collagène utilisée soit bovin (A), porcine (B), aviaire (C) ou avec seulement du chitosane (D).	51
Figure 21: Statistique de la taille moyenne des pores des éponges de collagène-chitosane selon la source de collagène utilisée (n=4).	52
Figure 22: Représentation graphique de la circularité des pores des biomatériaux selon la source de collagène utilisée où 1 représente un cercle parfait et 0 une ligne (n=4).	53

Figure 23: Résistance mécanique des équivalents dermiques en fonction du temps de culture selon la source de collagène utilisée.....	54
Figure 24: Déformation à la rupture des équivalents dermiques en fonction du temps de culture selon la source de collagène utilisée.....	55
Figure 25: Module d'élasticité des équivalents dermiques en fonction du temps de culture selon la source de collagène utilisée.....	56
Figure 26: Visualisation immunohistochimique des cellules (noyaux, en bleu) et de la MEC produite (décorine, en vert) après 7, 14, 21 et 35 jours de culture avec des fibroblastes dermiques humains (barre = 100µm).....	57
Figure 27: Visualisation histologique par coloration au trichrome de Masson (collagène en bleu et noyaux en rose foncé) après 7, 14, 21 et 35 jours de culture avec des fibroblastes dermiques humains (barre = 100µm).....	58
Figure 28: Comparaison de l'activité des MMP à différents temps de culture après l'ensemencement depuis le jour 0 jusqu'au jour 35 (A-E) et visualisation de l'activité globale des MMP tout au long de l'expérience(F) ($P < 0.001$ lorsque J0 est comparé aux autres jours d'analyse, non indiqués sur le graphique F) selon les sources de collagène.....	60
Figure 29: Comparaison de la mortalité relative à différents temps de culture après l'ensemencement depuis le jour 0 jusqu'au jour 35 (A-E) et visualisation globale de la mort cellulaire tout au long de l'expérience (F) selon les sources de collagène.....	62
Figure 30: Schématisation du processus de colonisation de l'éponge de collagène et de chitosane par des fibroblastes. Pénétration de la structure et remodelage de la matrice de l'éponge, durant les dix premiers jours (A). Production de MEC et remodelage de cette dernière, durant les semaines suivantes (B).....	69
Figure 31: Résultats préliminaires des tests de contraction d'épongesensemencées avec des fibroblastes dermiques humains (A-C) et avec aussi des cellules endothéliales (D-F) selon les source de collagène utilisées, après 14 de culture en condition immergée.....	73

Tableau 1: Principaux types de collagènes des cellules animales avec leur composition moléculaire de chaînes α et leur distribution dans le corps (modifié de (Alberts, Johnson et al. 2002)).....	18
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

(Termes anglais en *italique*)

3D	Tridimensionnel
Ac	Anticorps
AcP	Anticorps Polyclonales
ADP	Adénosine Diphosphate
AK	Adénylate Kinase
ATP	Adénosine Triphosphate
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco-Vogt Modification of Eagle's Medium</i>
DMEc	DMEM contenant 10% SVF plus antibiotiques
EDTA	Acide Éthylène Diamine Tétra Acétique
FTSG	<i>Full Thickness Skin Graft</i> (greffe de peau pleine épaisseur)
GAG	Glycosaminoglycan
GlcNAc	N-Acétyle Glucosamine
IF	Immunofluorescence
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
LOEX	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
M	Molarité
MEB	Microscopie Électronique à Balayage

MEC	Matrice extracellulaire
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
N	Normalité
NK	<i>Natural Killer</i>
OCT	<i>Optimum Cutting Temperature</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PMN	Polymorphonucléaire
STSG	<i>Split Thickness Skin Graft (greffe de peau mince)</i>
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TM	Trichrome de Masson
UTS	<i>Ultimate Tensile Strength</i>
UV	Ultra-violet

CHAPITRE I -
INTRODUCTION

Chapitre I - Introduction

1.1 La peau

La peau est un des organes les plus importants du corps humain. Elle est essentielle à la survie et possède de nombreuses fonctions physiologiques outre la protection contre les agressions physiques et biologiques. Cet organe couvre une surface d'environ 2 m² avec une épaisseur variable de 0,5 à 4 mm et peut peser jusqu'à 5 kg. Comme l'illustre la figure 1, la peau est composée de trois couches l'épiderme en surface et le derme sous-jacent et l'hypoderme en profondeur (Tortora 1994).

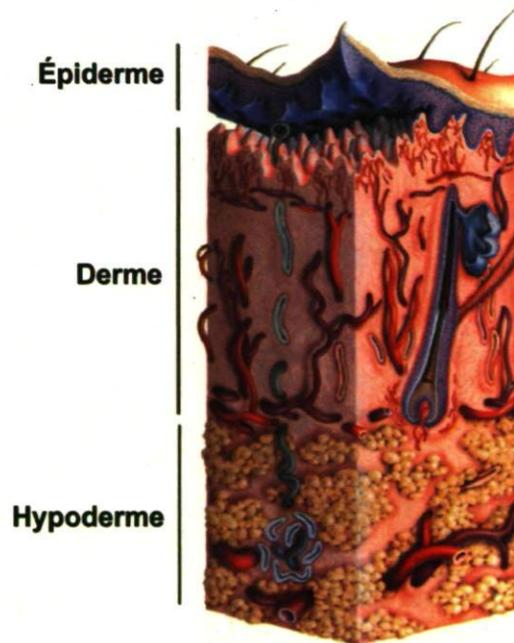


Figure 1: La peau normale humaine (modifiée de (Geras 1990)).

Comme mentionné précédemment, la peau possède plusieurs fonctions physiologiques autres que la protection contre l'environnement extérieur. Il y a la

thermorégulation du corps par la sudation et la vasodilatation en cas d'effort ou de chaleur intense et dans le cas contraire, la conservation de la chaleur corporelle par vasoconstriction des vaisseaux sanguins lors d'un abaissement de la température extérieure. Cet organe fait également le lien avec le monde extérieur grâce à ses nombreuses terminaisons nerveuses et récepteurs qui nous permettent de percevoir les stimuli qui nous entourent. Grâce à l'action des rayons ultraviolets (UV), la peau est capable de synthétiser la vitamine D à partir de son précurseur, la provitamine D. Mais cela ne représente que quelques-unes des fonctions que possède cet incroyable et essentiel organe (Tortora 1994).

1.1.1 L'épiderme

L'épiderme, partie superficielle de la peau, est composé d'un épithélium pavimenteux stratifié disposé en quatre à cinq couches selon la localisation : les stratum corneum, lucidum (peau glabre seulement), granulosum, spinosum et germinativum. Ces couches, identifiées dans la figure 2, contiennent quatre types cellulaires distincts. Cependant, la majorité sont essentiellement des kératinocytes, soit environ 90 % des cellules totales. Les autres types cellulaires sont les mélanocytes produisant la mélanine, pigment noir donnant sa coloration à la peau et absorbant les rayons UV, les cellules de Langerhans qui sont en quelque sorte l'extension du système immunitaire dans la peau et finalement les cellules de Merkel qui sont situées dans le stratum germinativum, soit à la jonction derme-épiderme, et qui sont les cellules de la perception tactile (Tortora 1994; Halata, Grim et al. 2003; Maricich, Wellnitz et al. 2009).

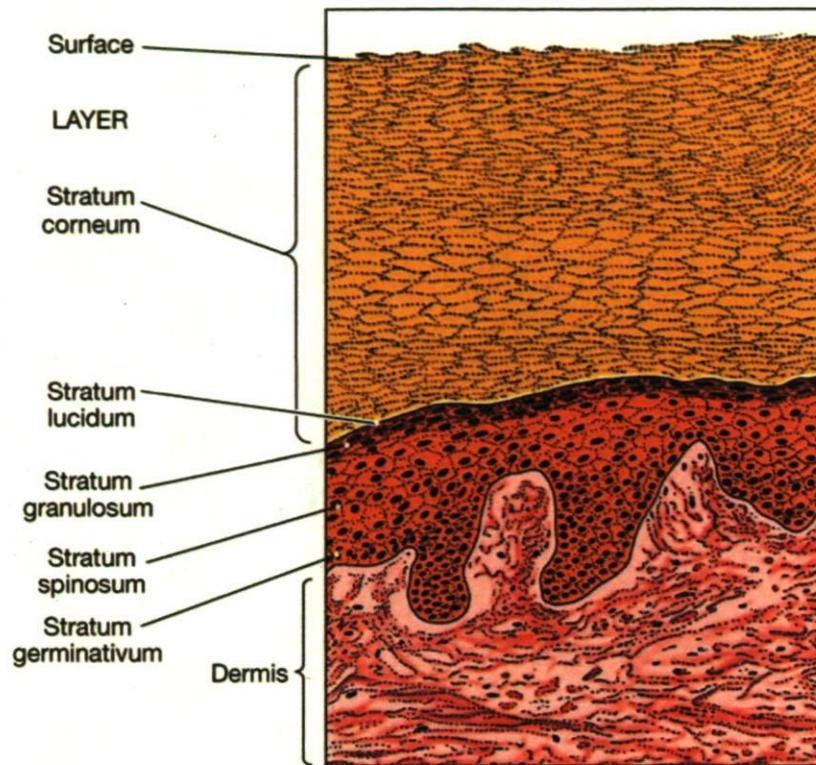


Figure 2: Les couches épidermiques (tirée de http://iupucbio2.iupui.edu/anatomy/images/Chapt04/FG04_03.jpg).

1.1.2 Le derme

Le derme, partie sous-jacente de l'épiderme, est un tissu conjonctif composé majoritairement de matrice extracellulaire (MEC), d'enchevêtrements de collagène, de protéoglycanes, de fibres élastiques ainsi que de fibroblastes. D'autres types cellulaires sont aussi présents en quantité beaucoup plus faible, mais leur présence est tout aussi essentielle. Ces cellules spécialisées forment les follicules pileux, les glandes sébacées et sudoripares qui sont des structures situées dans le derme. Cette région de la peau contient même des cellules souches appelées SKP (Toma, McKenzie et al. 2005) et plusieurs types de cellules nerveuses.

Le derme est divisé en deux parties soit papillaire et réticulaire, voir figure 3. La partie papillaire doit son nom aux motifs de crêtes et de crevasses appelés les papilles. Ces dernières bordent la jonction derme-épiderme. Ces papilles sont composées de minces fibres élastiques disposées de façon aréolaire. Cette zone contient un nombre important de boucles de capillaires ainsi que des terminaisons nerveuses relatives au toucher, appelé corpuscules tactiles de Meissner. La partie réticulaire, composant 4/5 de l'épaisseur du derme, est un tissu conjonctif beaucoup plus hétérogène que l'autre partie. Une multitude de structures fonctionnelles complexes y sont présentes : les follicules pileux, les glandes sébacées, les canaux des glandes sudoripares et une grande quantité de fibres nerveuses diversifiées. Le derme réticulaire est responsable de la solidité et de l'élasticité de la peau, qui lui sont conférées par une combinaison de fibres de collagène et de fibres élastiques (Tortora 1994).

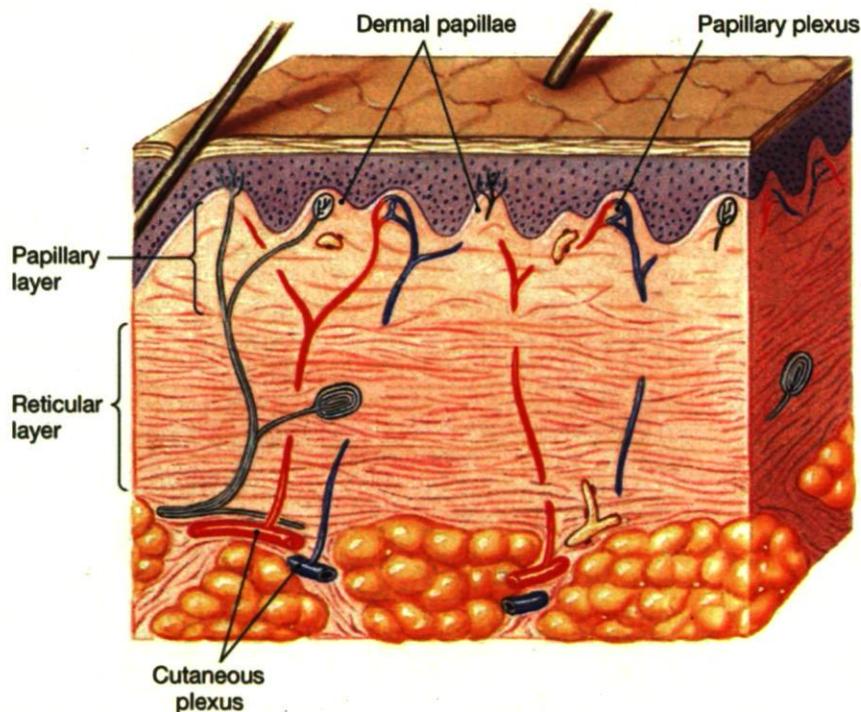


Figure 3: Les couches dermiques (tirée de http://iupucbio2.iupui.edu/anatomy/images/Chapt04/FG04_07.jpg).

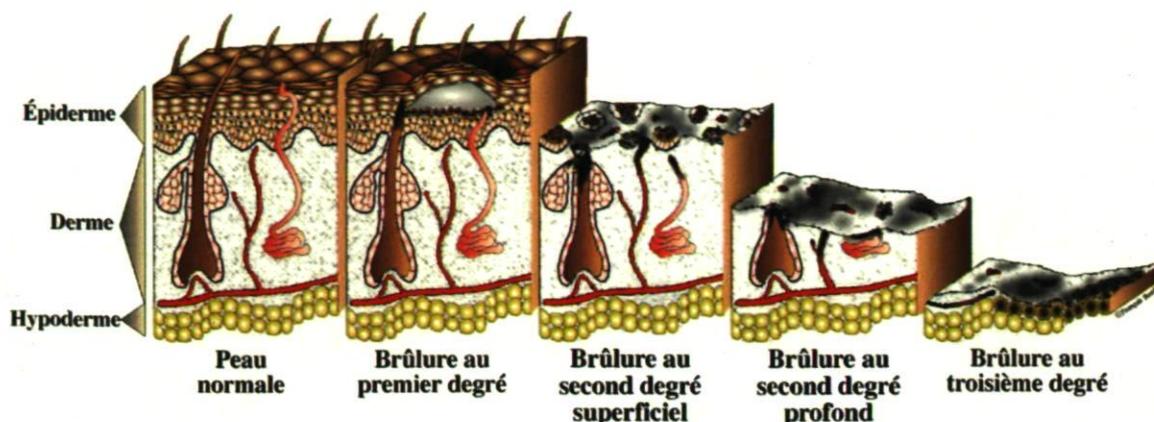
1.1.3 L'hypoderme

L'hypoderme est la couche sous-cutanée qui relie la peau aux structures biologiques sous-jacentes telles que les os et les muscles. Cette zone est composée principalement de tissu adipeux, mais aussi de tissu conjonctif. Elle contient des terminaisons nerveuses, telles que les corpuscules de Pacini, sensibles à la pression, et d'autres sensibles au froid. Les vaisseaux sanguins présents dans cette couche ont un diamètre supérieur à ceux du derme. Cette structure est importante pour la thermorégulation, le stockage des lipides et l'amortissement des chocs (Tortora 1994).

1.2 Les lésions cutanées

1.2.1 Les types de brûlures

Une brûlure peut être causée entre autres par la chaleur, l'électricité, les rayons UV, des produits chimiques, des radiations ou par la friction. Le temps et l'intensité d'exposition à ces différents facteurs entraînent des brûlures de gravités variables. Les degrés de brûlures vont comme suit de la plus superficielle à la plus profonde : les lésions de premier degré affectant seulement l'épiderme, celles de deuxième degré superficiel touchant l'épiderme et seulement le derme papillaire, de deuxième degré profond détruisant l'épiderme et le derme jusqu'à sa partie réticulaire et finalement celles de troisième degré détruisant l'épiderme et le derme, en totalité, et pouvant même toucher l'hypoderme et les structures sous-jacentes telles que les os et les muscles. (Tortora 1994; Hettiaratchy and Dziewulski 2004; Connor-Ballard 2009). L'illustration de la figure 4 permet de bien visualiser tous les types de brûlures, de la peau saine à gauche jusqu'à une lésion de troisième degré à droite.



© LOEX CH Québec UNIVERSITÉ LAVAL

Figure 4: Les types de brûlures (François Berthod, LOEX).

1.2.2 La réaction corporelle aux brûlures

La réaction du corps à une brûlure se produit à deux échelles soit localisée et systémique.

La réaction localisée est répartie de manière tridimensionnelle et caractérisée par trois zones distinctes, décrites par Jackson en 1947 et illustrées à la figure 5. La zone centrale ou de coagulation est la région la plus touchée. À cet endroit, la blessure est irréversible due à la coagulation des protéines; c'est ici qu'il y aura nécrose. La zone intermédiaire, en périphérie immédiate de la zone de coagulation, est aussi appelée zone de stase. Cette partie de la lésion présente un apport sanguin réduit, une inflammation et des dommages tissulaires. C'est cette portion de la brûlure qui doit être traitée rapidement, en rétablissant la circulation sanguine et en empêchant la dégradation des tissus. La troisième partie de la brûlure, appelée zone d'hyperémie, est celle en périphérie. Cette surface est la moins endommagée de toutes. Cet endroit de la lésion est le plus propice à une rémission totale. Cependant, l'absence de traitements adéquats ou la non-prise en charge d'une

infection peuvent mener à la perte de tissu dans la zone de stase voire même dans la zone périphérique d'hyperémie (Hettiaratchy and Dziewulski 2004).

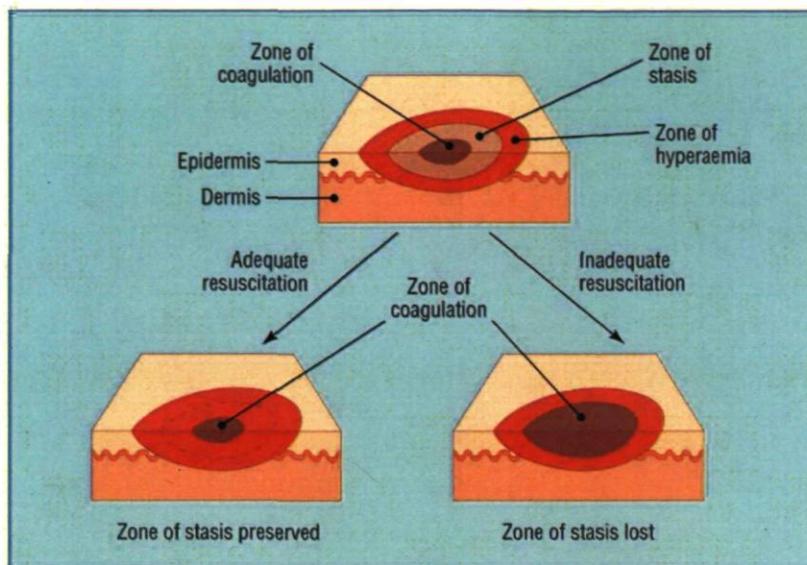


Figure 5: Les zones de brûlures (tirée de (Hettiaratchy and Dziewulski 2004)).

La réaction systémique se produit lorsque la brûlure atteint plus de 30% de la surface corporelle. Lorsque la lésion représente une surface aussi importante, les cytokines et les médiateurs de l'inflammation libérés atteignent une concentration sanguine qui déclenche des changements cardiovasculaire, immunologique, métabolique et respiratoire. Ces effets varient d'une baisse non spécifique de la réponse immunitaire jusqu'à une hypoperfusion des organes situés aux extrémités du corps. Il peut également y avoir une augmentation de l'activité métabolique, pouvant atteindre trois fois la normale. Cela peut même provoquer des syndromes de détresse respiratoire dans des cas sévères. Lorsque plus de 30% de la surface corporelle est atteinte par des lésions graves, une importante perte de fluide se produit. Cette perte de fluide mène souvent à la mort du patient par hypotension. De plus, ces plaies sont la porte d'entrée de plusieurs sources de pathogènes qui peuvent engendrer diverses infections et même mener à une septicémie, pouvant être une autre cause de mortalité chez les grands brûlés (Hettiaratchy and Dziewulski 2004).

1.2.3 Le processus de guérison d'une lésion cutanée

La guérison d'une lésion cutanée est généralement décrite en trois phases soit inflammatoire, proliférative et de remodelage. Cette description des trois stades de la guérison d'une plaie date du début du XXe siècle et est attribuable en grande partie à Alexis Carrel (Wysocki 1999).

Lorsqu'une lésion cutanée sévère se produit, telle qu'une brûlure au deuxième degré, la première réaction du corps consiste en la libération de médiateurs de l'inflammation afin de recruter des cellules de l'immunité telles que des monocytes, des lymphocytes, des neutrophiles, et des plaquettes sanguines. Immédiatement après, il y a constriction des vaisseaux sanguins. C'est le début de la réaction de coagulation. Cette réaction utilisant les plaquettes précédemment recrutées et la fibrine est essentielle à l'hémostase et au déclenchement de la phase inflammatoire. Le caillot de fibrine formé lors de cette réaction, essentiel au maintien de l'hémostase, servira aussi d'échafaudage à la régénération subséquente de la plaie. Cette première étape de la guérison de la plaie est attribuable à la libération de facteurs tels que le PDGF et le TGF- β par les plaquettes. Ensuite, la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires au site de la lésion engendre le recrutement de fibroblastes, de cellules endothéliales et de macrophages (Singer and Clark 1999; Beanes, Dang et al. 2003).

Le stade inflammatoire, suivant la réaction de coagulation, se divise en deux étapes soit initiale, durant les premières 24 heures, et tardive, durant les deux à trois premiers jours. La première phase de l'inflammation est caractérisée par la présence de cellules polymorphonucléaires, assurant l'intégrité du lit de la plaie, en y dégradant les matières infectieuses et les débris, par la libération d'enzymes telles que les protéinases. Ensuite, il y a la phase tardive caractérisée par la présence des macrophages, qui sont essentiels de par leur sécrétion de facteurs de croissance. Les facteurs sécrétés, comme le TGF- β et α , le bFGF, l'IGF-1 et le PDGF, engendrent le recrutement de plusieurs types cellulaires, tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales. Ces interactions intercellulaires ont alors pour effet de réguler la sécrétion et l'organisation de la MEC (Singer and Clark 1999; Beanes, Dang et al. 2003).

Le stade prolifératif débute donc avec l'arrivée massive de fibroblastes qui sécrètent du collagène en quantité importante. Après quelques jours post-lésion, la majeure partie du lit de la plaie est colonisée par des fibroblastes. La sécrétion de collagène de type I et III permet de consolider le tissu de granulation et d'offrir un support aux autres types cellulaires qui migrent dans la lésion. C'est aussi à ce stade que les cellules épithéliales commencent à migrer vers le centre de la plaie. Cette croissance de l'épithélium périphérique libère des facteurs pro-angiogéniques qui engendrent le recrutement des cellules endothéliales dans le tissu de granulation. Cette étape de réépithélialisation et de néovascularisation débute avec la prolifération des fibroblastes et leur production de collagène soit environ cinq jours après la lésion et se prolonge pendant plusieurs semaines (Singer and Clark 1999; Beanes, Dang et al. 2003).

Lorsque la quantité de MEC produite est suffisante, une grande partie des fibroblastes recrutés pour la produire entre en apoptose et le stade de remodelage s'enclenche. Un équilibre s'établit entre la production et la dégradation du collagène et une transition s'effectue entre le tissu de granulation et la cicatrice qui se forme. La différenciation de certains fibroblastes en myofibroblastes est un autre élément qui vient affecter les caractéristiques de la cicatrice à long terme du fait de leur phénotype contractile. La présence de métalloprotéinases (MMP) et d'inhibiteurs de ces dernières (TIMP) sera aussi un élément important dans l'apparence macroscopique de la lésion pendant et après sa guérison [7, 8].

1.3 Les types de recouvrement

Lors de lésions profondes et étendues de la peau telles que les brûlures sévères, la remise en place d'une barrière entre la plaie et l'environnement extérieur est très importante. Ce recouvrement des plaies a pour but de minimiser la perte de fluide corporel et d'empêcher l'entrée de pathogènes dans l'organisme (Yannas and Burke 1980; Baxter and Waeckerle 1988). Cette intervention est donc cruciale pour la survie des patients et c'est pourquoi la mise au point de méthodes temporaires de recouvrement des plaies est si

importante. Par la suite, les méthodes permanentes de recouvrement entrent en ligne de compte pour ce qui est de la gestion des côtés esthétique et fonctionnelle de la cicatrisation des plaies (Yannas and Burke 1980).

1.3.1 Les méthodes temporaires de recouvrement

Deux types temporaires de recouvrement de plaies existent soit un biologique et un autre synthétique. Les méthodes temporaires synthétiques de recouvrement comprennent tous les types de pansements conventionnels. Avant l'apparition de techniques plus efficaces, les plaies étaient nettoyées et recouvertes avec des gazes imbibées de saline afin que le lit de la plaie soit débarrassé de tous débris cellulaires et de substances infectieuses. Par la suite, le tissu de granulation sain subissait une greffe de peau provenant d'une zone saine, le site donneur (Townsend CM 2004; Brunnicardi FC and JG 2005). Maintenant, plusieurs autres techniques synthétiques de recouvrement de plaies sont disponibles avec des propriétés antimicrobiennes conférées grâce à des produits comme le sulfadiazine d'argent. Il faut aussi mentionner que les techniques de chirurgie modernes permettent de nettoyer davantage le lit de la plaie (Townsend CM 2004; Whitaker, Prowse et al. 2008). Les hydrogels, de collagène ou de chitosane entre autres, sont un autre type de recouvrement de plaies qui donne des résultats intéressants. Plusieurs études démontrent qu'ils sont efficaces, confortables pour les patients et faciles à utiliser pour le personnel médical (Yates and Hadfield 1984; Burd 2007; Kiyozumi, Kanatani et al. 2007; Sezer, Cevher et al. 2008). Les substituts acellulaires synthétiques généralement produits à base de collagène sont une autre innovation majeure dans le traitement temporaire des plaies. Plusieurs de ces biomatériaux sont actuellement disponibles en tant que méthode temporaire de recouvrement. Grâce aux percées du génie biomédical et au développement de ce secteur économique, un éventail de ces pansements synthétiques est désormais disponible sur le marché. Dans cette catégorie, on peut citer TransCyte™, une MEC d'origine allogénique aussi enduite de silicone et agissant à titre de substitut épidermique; Matriderm™ une matrice acellulaire de collagène bovin et d'élastine illustrée à la figure 6 ainsi que Biobrane™, une membrane de collagène porcin juxtaposée à une membrane de

silicone et de nylon (Auger, Lacroix et al. 2009; Hosseini, Mousavinasab et al. 2009). En ce qui concerne les recouvrements biologiques temporaires, la plupart sont des xéno greffes porcines, des allogreffes de peau de cadavres avec ou sans cellules ou des membranes amniotiques (Lineen and Namias 2008; Auger, Lacroix et al. 2009; Hosseini, Mousavinasab et al. 2009).

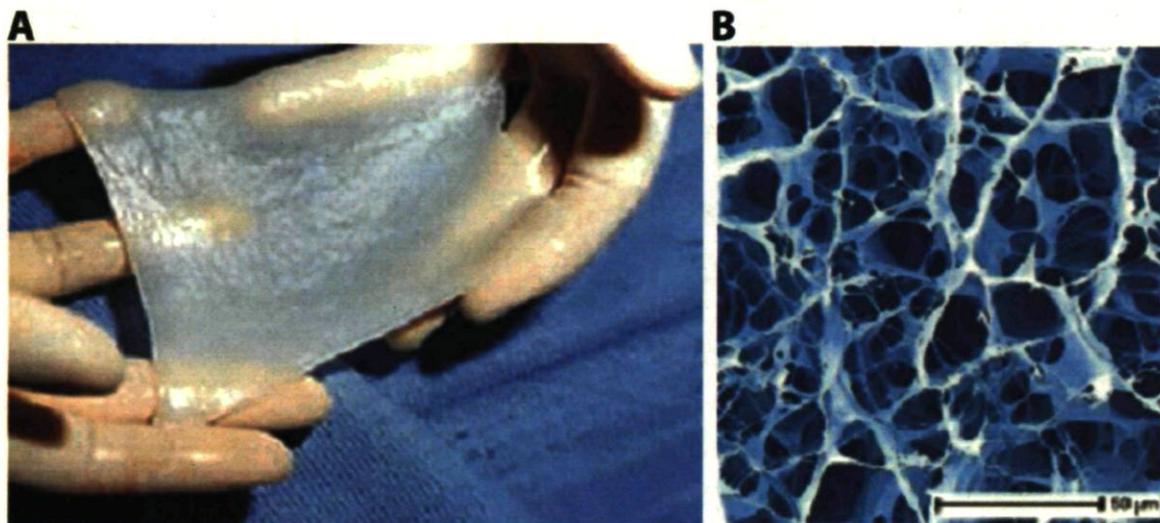


Figure 6: Vue macroscopique (A) et microscopique (B) du recouvrement temporaire Matriderm™ (modifiée de <http://www.skin-healthcare.de>).

1.3.2 Les méthodes permanentes de recouvrement

Les recouvrements biologiques permanents sont donc la suite logique de la procédure chirurgicale menant à la rémission du patient. Ce type de recouvrement compte un grand nombre de produits qui peuvent être classés en trois grandes catégories : les substituts épidermiques, les substituts dermiques et les substituts bicouches. Les substituts épidermiques tels que Epicel™, Laserskin™, Myskin™ sont des feuillets de kératinocytes autologues sur des membranes diverses (gaze vaselinée, matrice d'acide hyaluronique, silicone). Ce type de substituts est utilisé pour le recouvrement des lésions cutanées superficielles à profondes et aussi pour le recouvrement des sites donneurs lors de greffes

de type STSG (Split Thickness Skin Graft). Cependant, on doit compter environ quatre semaines suivant la prise de la biopsie servant à extraire les cellules avant l'obtention de feuillets greffables. Les substituts dermiques sont conçus selon des techniques beaucoup plus variables que ne le sont les substituts épidermiques. Certains sont des dermes décellularisés humains comme Alloderm™ et Repliform™. Alors que d'autres sont des matrices extracellulaires synthétiquesensemencées de fibroblastes autologues ou allogéniques tels que Hyalograft 3D™, Dermagraft™ ou ICX-SKN™. Finalement, les substituts bicouches autologues, qui sont un agencement des deux méthodes de recouvrement précédentes, sont composés d'une couche de kératinocytes juxtaposée à un substitut dermique contenant lui-même des fibroblastes. Ces substituts cutanés permanents sont complètement autologues; on y trouve PermaDerm™, TissueTech™ autograft system et le substitut cutané du LOEX, schématisé à la figure 7. Cependant, ces derniers ne sont présentement pas disponibles commercialement, dus principalement au temps de culture *in vitro* considérable nécessaire à leur production (Lineen and Namias 2008; Auger, Lacroix et al. 2009).

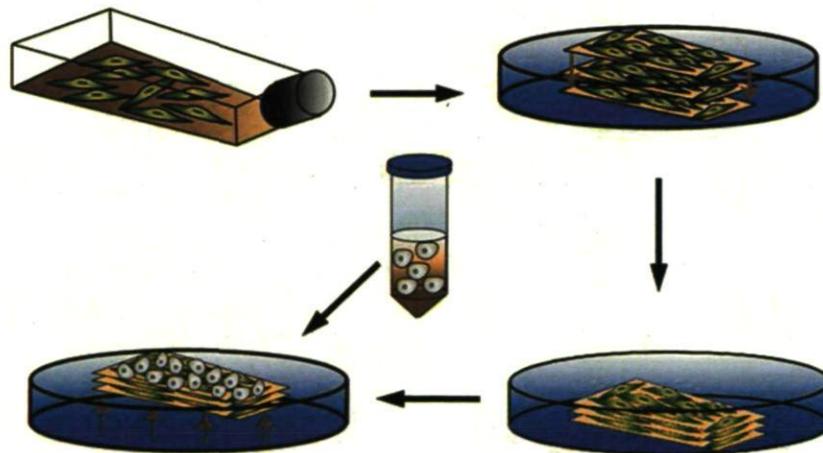


Figure 7: Procédé d'auto-assemblage du LOEX consistant en la superposition de trois feuillets de fibroblastes subséquentementensemencée avec des kératinocytes (Alexandre Deschambaud, LOEX).

1.3.3 Les types de greffes

Il existe deux types de greffes de peau soit pleine épaisseur (Full Thickness Skin Graft, FTSG) ou mince (Split Thickness Skin Graft, STSG), illustrées respectivement en A et B de la figure 8. Les greffes de type FTSG comprennent l'épiderme, le derme et l'hypoderme pouvant même aller jusqu'au prélèvement de vaisseaux sanguins et de muscles dans les cas où la zone à greffer est très endommagée ou bien à des endroits esthétiquement plus importants comme le visage. Par contre, les greffes de type STSG ne prélèvent que l'épiderme et une partie du derme ce qui permet au site donneur de cicatriser, contrairement à une FTSG qui laisse une plaie équivalente à une brûlure de 3^e degré. Dans la plupart des cas de brûlures sévères, c'est ce dernier type de greffon qui est employé (Mackay DR 2006).

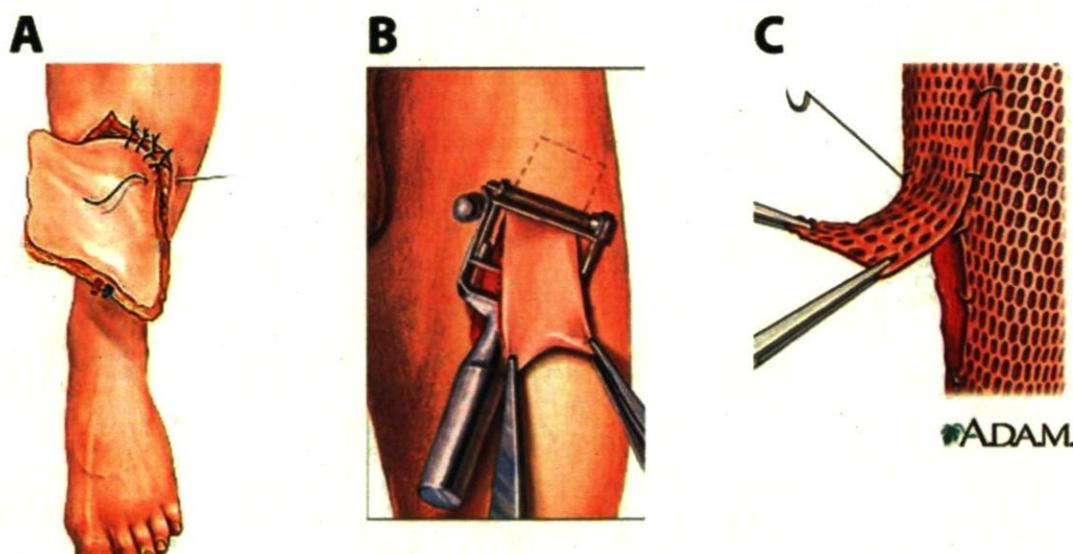


Figure 8: Types de greffes de peau pouvant être prélevées : pleine épaisseur ou FTSG (A), mince ou STSG (B) et en filet ou mesh-graft (C) (modifiée de <http://www.clarian.org/ADAM/doc/WomenCenter/3/100098.htm> et <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19083.htm>).

Lorsque les lésions s'étendent sur de très grandes surfaces et que la superficie de sites donneurs est insuffisante, les greffons de type STSG, peuvent être faits en filet (mesh-graft), visualisation en C de la figure 8 ci-dessus. Ce qui veut dire que le greffon prélevé est soit cisailé manuellement au scalpel ou passé dans une machine qui crée des mailles, comme dans un filet, selon un ratio prédéterminé pouvant aller jusqu'à 1 : 6 selon l'appareil, voir figure 9. Le greffon en filet ainsi obtenu, couvrant entre deux et six fois la superficie initiale du prélèvement, est appliqué sur la zone à couvrir et suturé. Les greffes de type FTSG sont, quant à elles, rarement faites en filet étant donné que leur utilisation vise principalement l'obtention d'un résultat esthétique (Taghizadeh and Gilbert 2008).

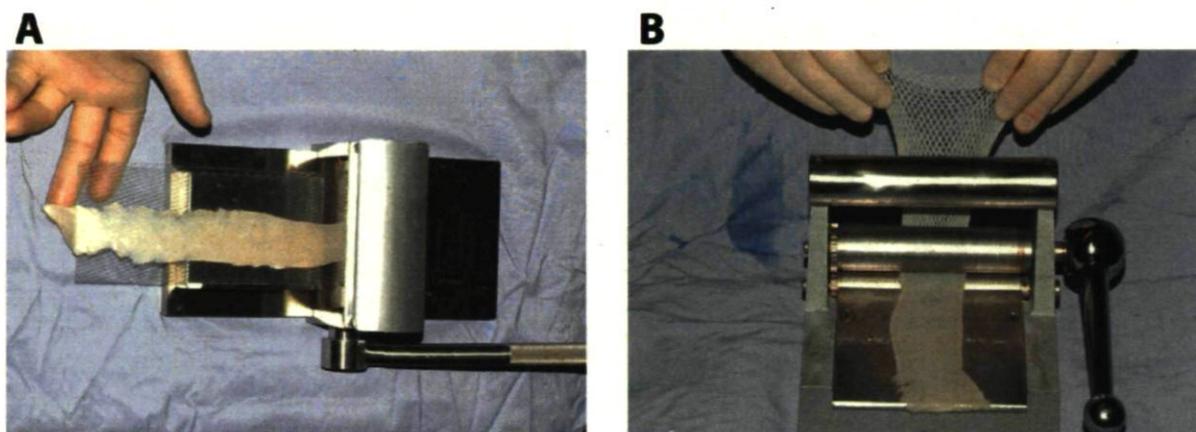


Figure 9: Types de mesher pouvant être utilisés soit avec un support amovible déterminant le ratio (A) ou avec un ratio fixe (B) (modifiée de (Taghizadeh and Gilbert 2008)).

1.4 Le collagène

1.4.1 Biosynthèse et structure

Le collagène est une protéine fibreuse sécrétée par le tissu conjonctif de tous les animaux. Certains types cellulaires, en dehors des tissus conjonctifs, en produisent aussi. Le collagène est une composante majeure de la peau et des os. Cette protéine représente environ 25% de la masse protéique totale des mammifères. La représentation typique d'une

molécule de collagène est une longue corde à trois brins, trois chaînes polypeptidiques appelées chaînes α . Le collagène contient beaucoup de résidus hydroxyproline et glycine soit respectivement 10-13 % et 33% des acides aminés totaux (Stenzel, Miyata et al. 1974). C'est cette très forte concentration en acides aminés de petite taille, mais surtout la présence de glycine à chaque trois résidus, qui permet à la trophélice de collagène d'être aussi compacte (Alberts, Johnson et al. 2002).

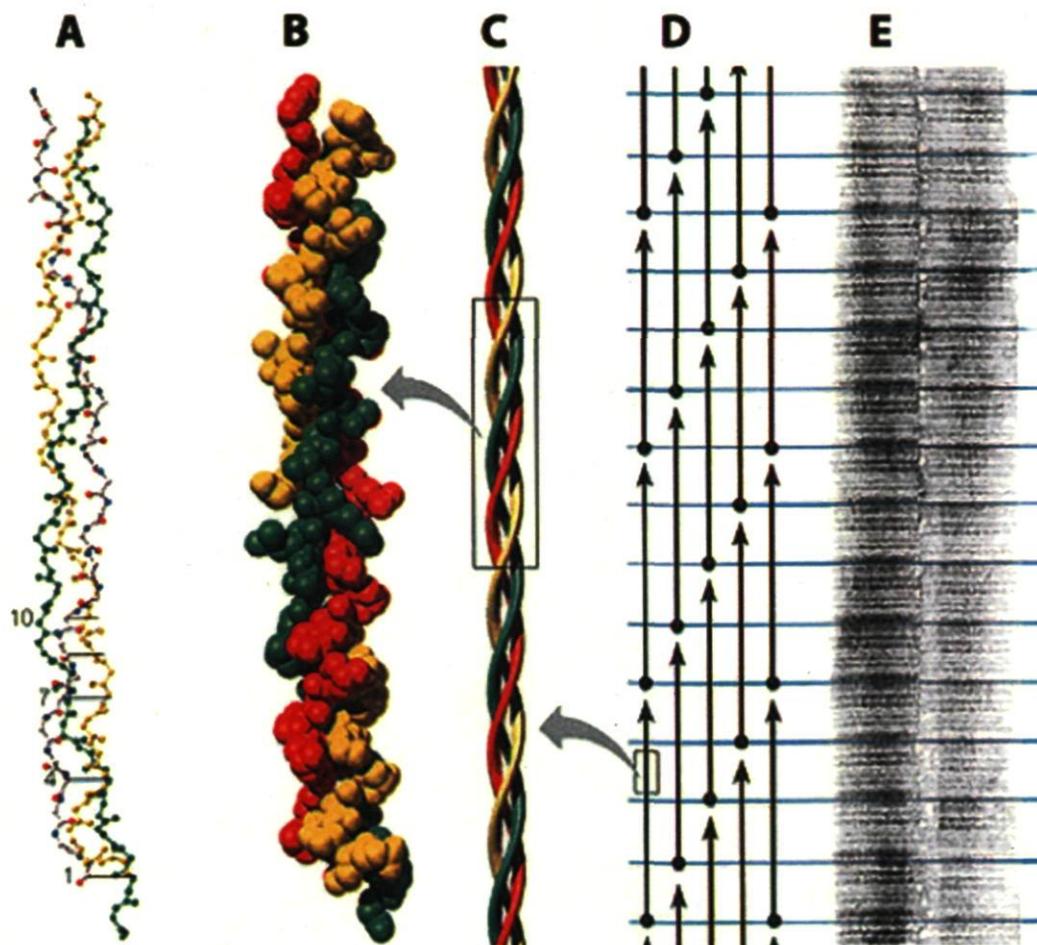


Figure 10: Structure du collagène à différentes échelles : composition en acides aminés (A), représentation atomique compacte (B), molécule de tropocollagène (triple hélice de chaîne α) (C), représentation structurale d'une fibre de collagène (D) et image de microscopie électronique à transmission (E) (modifiée de http://web.mit.edu/3.082/www/team1_f02/collagen.htm).

Il existe environ vingt-cinq chaînes α différentes qui sont chacune produites à partir d'un gène différent. Différents agencements, homogènes ou hétérogènes, de chacune de ces chaînes α forment la vingtaine de types de collagènes connus à ce jour. Le tableau 1 décrit brièvement quelques types de collagènes, leur famille, leur composition en chaînes α et leur distribution dans le corps. Récemment, un nouveau type de collagène épidermique a été découvert, portant à vingt-neuf le nombre total de collagènes connus (Soderhall, Marenholz et al. 2007). Les collagènes de types I, II, III, V et XI sont ceux qui sont principalement retrouvés dans les tissus conjonctifs (Alberts, Johnson et al. 2002). Ce sont aussi ces types de collagènes qui sont dits fibrillaires. Ces cinq types de collagènes ont des propriétés similaires qui leur confèrent cette structure fibrillaire soit : chacun de ces types de collagène forme une molécule de tropocollagène ayant un domaine hélicoïdal contenant 1000 résidus aminés ou 330 répétitions -Gly-X-Y- par hélice, ils sont tous synthétisés sous forme de larges précurseurs nécessitant des clivages N et C terminaux et ils s'assemblent tous en fibres de collagène striées où chaque fibrille est placée de manière à être décalée d'un quart de sa longueur vis-à-vis ses voisines, voir figure 10 (Prockop and Kivirikko 1995). La distinction entre ces 5 types de collagènes provient principalement de leur composition en chaînes α . Le collagène de type I, composé de deux hélices $\alpha 1$ et d'une $\alpha 2$ est le principal type de collagène présent dans la peau normale humaine. Ce type de collagène qui se retrouve également dans les os, les ligaments, la cornée et les organes internes équivaut à 90% de tout le collagène du corps (Alberts, Johnson et al. 2002).

	TYPE	MOLECULAR FORMULA	POLYMERIZED FORM	TISSUE DISTRIBUTION
Fibril-forming (fibrillar)	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	fibril	bone, skin, tendons, ligaments, cornea, internal organs (accounts for 90% of body collagen)
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	fibril	cartilage, intervertebral disc, notochord, vitreous humor of the eye
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	fibril	skin, blood vessels, internal organs
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ and $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	fibril (with type I)	as for type I
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(IX)\alpha 3(XI)$	fibril (with type II)	as for type II
Fibril-associated	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	lateral association with type II fibrils	cartilage
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	lateral association with some type I fibrils	tendons, ligaments, some other tissues
Network-forming	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	sheetlike network	basal lamina
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	anchoring fibrils	beneath stratified squamous epithelia
Transmembrane	XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	not known	hemidesmosomes
Others	XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	not known	basal lamina around blood vessels

Note that types I, IV, V, IX, and XI are each composed of two or three types of α chains, whereas types II, III, VII, XII, XVII, and XVIII are composed of only one type of α chain each. Only 11 types of collagen are shown, but about 20 types of collagen and about 25 types of α chains have been identified so far.

Tableau 1: Principaux types de collagènes des cellules animales avec leur composition moléculaire de chaînes α et leur distribution dans le corps (modifié de (Alberts, Johnson et al. 2002)).

La biosynthèse du collagène, schématisée à la figure 11, commence par la synthèse de pro-chaînes α par les ribosomes dans le réticulum endoplasmique et ensuite à leur transfert dans l'appareil de Golgi. Lors de ce transit, des résidus prolines et lysines sont hydroxylés, des hydroxylysines sont glycosylées pour ensuite permettre l'auto-assemblage de trois pro-chaînes α . La triple hélice de procollagène ainsi formée est sécrétée jusqu'à la membrane plasmique où les propeptides, sont clivés aux extrémités, avant l'auto-assemblage des tropohélices de collagène en fibrilles d'environ 10 à 300 nm de diamètre. Les propeptides sont clivés à l'extérieur de la cellule afin d'éviter la polymérisation du collagène dans les cellules. La polymérisation en fibrille de collagène se produit grâce à des liaisons covalentes principalement entre des résidus lysines et hydroxylysines situés aux extrémités non-hélicoïdales, télépeptides, des tropohélices de collagène. Il peut y avoir ensuite agrégation des fibrilles en fibres de collagène allant de 0,5 à 3 μm de diamètre, ces dernières étant alors visibles en microscopie optique (Alberts, Johnson et al. 2002).

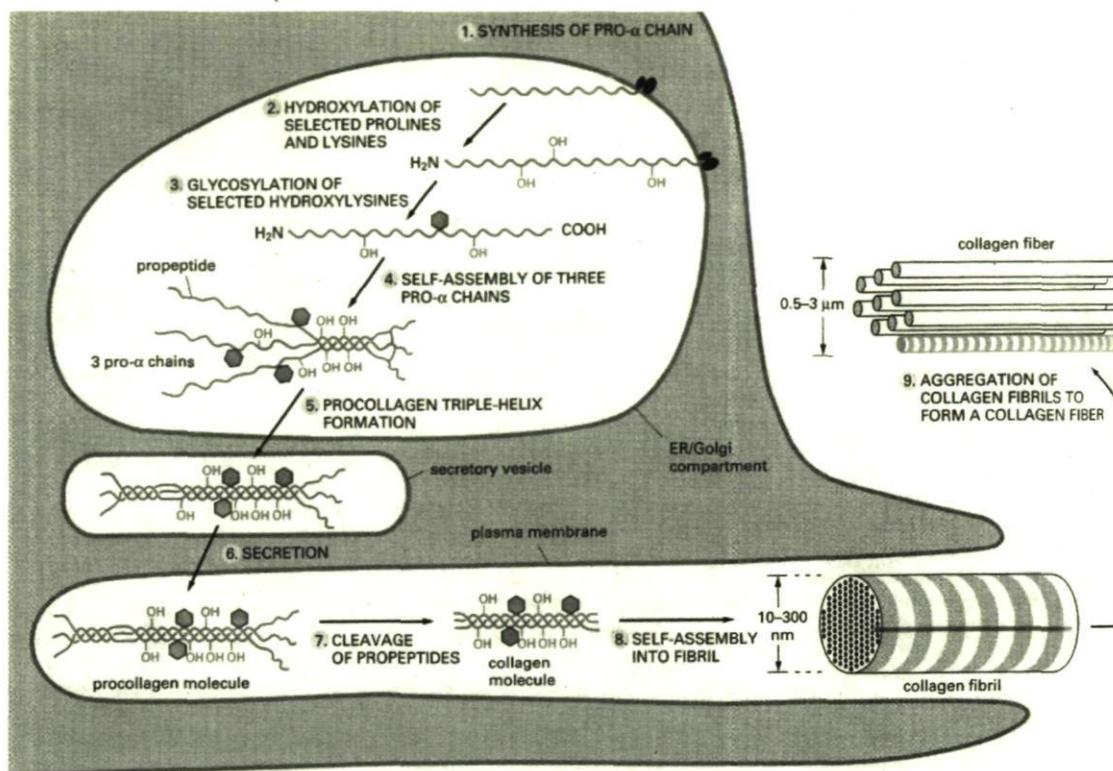


Figure 11: Diagramme d'assemblage du collagène en neuf étapes, de la synthèse peptidique à la formation des fibres de collagène (modifiée de (Alberts, Johnson et al. 2002)).

Cependant, cette description de la structure finale du collagène s'applique principalement aux collagènes de types I, II, III, V et XI. Les autres types de collagènes ont des fonctions connexes ou indépendantes : soit d'association latérale aux collagènes fibrillaires, soit de formation de réseaux interstructuraux comme dans la lame basale, ou encore de liaisons transmembranaires comme dans les hémidesmosomes. Mais certaines fonctions restent encore incomprises. Tous ces types de collagènes ainsi que les glycosaminoglycanes qui viennent s'y attacher sont néanmoins essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Ces derniers forment des associations avec les fibrilles de collagènes et sont indispensables à la mise en place d'une structure stable et organisée de fibres de collagènes. (Alberts, Johnson et al. 2002).

1.4.2 Immunogénicité et antigénicité

Il est important de la distinction entre les termes immunogénicité d'une part, qui vise le déclenchement d'une réponse immunitaire et antigénicité qui, d'autre part, réfère seulement à l'interaction entre les antigènes et les anticorps produits lors de la réaction immunitaire (Crumpton 1974). Les déterminants antigéniques ou épitopes, sont les parties d'une molécule, comme le collagène, qui sont responsables du déclenchement de la réaction immunitaire par liaison avec un anticorps, produit par les lymphocytes B (réponse immunitaire humorale), ou en étant reconnu par un lymphocyte T comme ne faisant pas partie du soi (réponse immunitaire cellulaire) (Alberts, Johnson et al. 2002).

La réaction immunitaire contre le collagène est principalement dirigée vers des épitopes de la région des télépeptides, présents aux extrémités des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Schmitt, Levine et al. 1964; Davison, Levine et al. 1967; Steffen, Timpl et al. 1968). Même si ce sont les parties les plus immunogènes, l'antigénicité du collagène ne se résout pas seulement à ces extrémités ou zones terminales. Deux autres facteurs entrent en ligne de compte, la conformation 3D de la partie hélicoïdale du tropocollagène et celle de la partie centrale de la triple hélice lorsque le collagène est sous forme de fibrilles ou de fibres. En effet, sous cette conformation seules les séquences d'acides aminés en surface des fibres de collagènes ont une immunogénicité (Michaeli, Martin et al. 1969; Furthmayr, Beil et al. 1971; Lindsley, Mannik et al. 1971; Timpl, Beil et al. 1971; Beil, Timpl et al. 1973; Furthmayr and Timpl 1976).

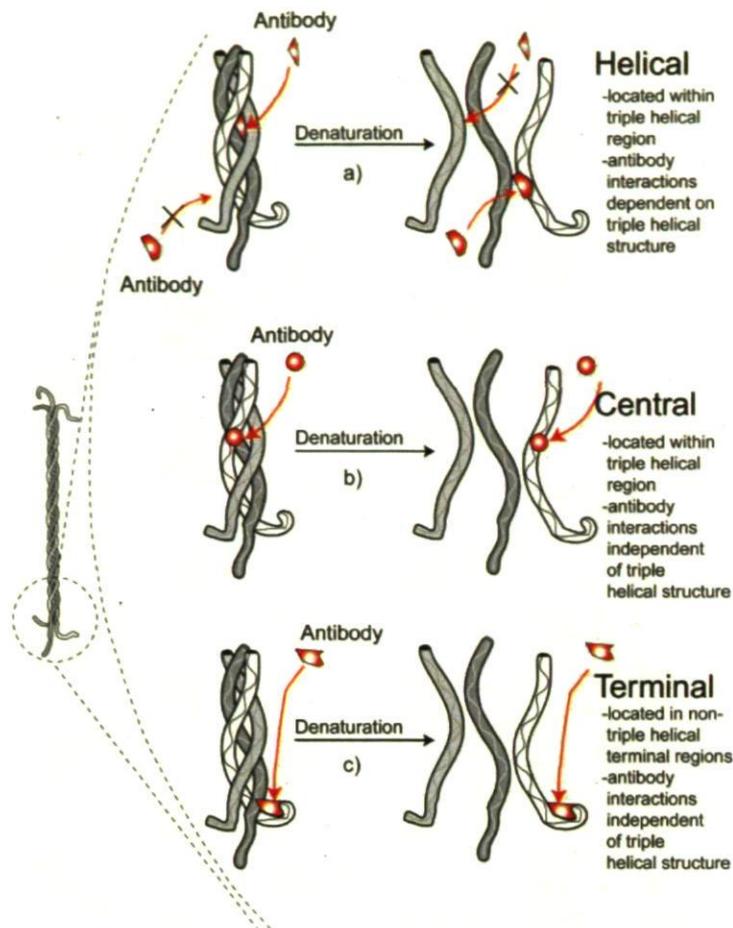


Figure 12: Classification des déterminants antigéniques du collagène (tirée de (Furthmayr and Timpl 1976)).

Cette localisation des déterminants antigéniques, visualisable dans la figure 12, permet de comprendre pourquoi la molécule complète de collagène, fibrille ou fibre, est moins immunogène que ses constituants initiaux, chaînes α et tropocollagène (Lindsley, Mannik et al. 1971). Donc le fait de réticuler le collagène avec des agents chimiques ou physiques le rend moins immunogène, et ce, de deux façons : en masquant des épitopes et en ralentissant son taux de dégradation, et de ce fait la libération de constituants plus immunogènes (Weadock, Miller et al. 1996; Harriger, Supp et al. 1997).

Il a été démontré qu'un faible pourcentage de la population (environ 3 %) possédait une immunité humorale acquise contre le collagène de type I. Cela permet d'avoir une idée

de l'implantabilité des biomatériaux à base de collagène par de simples tests sérologiques, soit le dosage des anticorps anti-collagène de type I circulant dans le sang (Charriere, Bejot et al. 1989; Eaglstein, Alvarez et al. 1999). Et même dans les rares cas où une allergie au collagène de type I se déclenche, les symptômes peuvent être traités de manière définitive par une simple administration orale de cyclosporine d'une durée inférieure à trois semaines (Baumann and Kerdel 1999).

1.4.3 Méthodes d'extraction

Il existe principalement trois méthodes d'extraction du collagène de type I à partir de divers échantillons biologiques, tels que la peau ou les tendons. Ces extractions sont effectuées par solubilisation du collagène avec soit, des solutions contenant des acides (Steven F. S. 1961; Steven and Tristram 1962; Steven and Jackson 1967; Rajan, Habermehl et al. 2006), soit des sels neutres (Eastoe 1955; Gross, Highberger et al. 1955), soit des enzymes protéolytiques (Grant and Alburn 1960; Steven 1964; Drake, Davison et al. 1966). Cependant, le collagène extrait par la méthode enzymatique est légèrement différent en ce qui concerne sa structure, ceci étant visualisable par microscopie électronique (Francis and MacMillan 1971). Cette différence structurale est due au fait que l'extraction protéolytique à l'amylase ou à la pepsine engendre le clivage des extrémités des molécules de tropocollagène, ou télépeptide, ce qui empêche la formation de fibrilles (Rubin, Pfahl et al. 1963).

La méthode d'extraction acido-basique est celle qui possède le meilleur ratio de protéines solubilisées par rapport aux protéines dénaturées. Cette méthode consiste en la solubilisation du collagène sous sa forme fibrillaire avec une combinaison d'acides forts et d'acides faibles, souvent l'acide acétique, à un pH avoisinant 3,0. L'efficacité de l'extraction est augmentée par l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl) 1,0 N, pour atteindre un pH de 2,5, des inhibiteurs de protéase peuvent aussi être ajoutés pour diminuer la dégradation endogène du collagène (Steven and Tristram 1962; Miller and Rhodes 1982).

L'utilisation d'une solution de sels neutres et d'inhibiteurs de protéases résulte en un produit de grande pureté et sans trace de dégradation. Cependant, les quantités extraites sont très faibles étant donné que le collagène solubilisé est seulement celui qui n'est pas polymérisé sous forme fibrillaire. Pour ce faire, l'échantillon à extraire est laissé à tremper dans une solution de chlorure de sodium de 0,15 à 1,0 M à pH neutre pendant plusieurs heures avec agitation (Gross, Highberger et al. 1955; Miller and Rhodes 1982).

L'extraction enzymatique, utilisant soit l' α -amylase soit la pepsine, ressemble beaucoup à l'extraction par solution acide à la seule différence qu'au lieu d'ajouter un inhibiteur de protéases on ajoute une protéase, comme la pepsine. Cette méthode a pour principale caractéristique d'extraire la majeure partie du collagène présent dans l'échantillon et c'est pourquoi elle est l'une des plus utilisées. Cependant, tout le collagène extrait est partiellement dénaturé et donc ne contient presque plus de télépeptides ou sinon des télépeptides modifiés dans sa portion non-hélicoïdale. La solubilisation se fait donc dans une solution d'acide acétique de 0,2 à 0,5 M contenant de la pepsine, et ce, dans un intervalle de pH de 2,5 à 3,0. La pepsine est utilisée à un ratio massique d'environ 1 : 10 enzyme : échantillon sec (Steven 1964; Miller 1972; Miller and Rhodes 1982).

Dans les trois cas, la solubilisation du collagène dans les différentes solutions prend plusieurs heures, de 12 à 24, avec une agitation constante. Par la suite, ces solutions contenant le collagène solubilisé sont filtrées avant d'être centrifugées à très haute vitesse dans des ultracentrifugeuses. La force centrifuge ainsi générée, allant de 40 000 à 100 000 g, permet la sédimentation des débris et la récupération du surnageant contenant le collagène à extraire. La quantité de débris en suspension est souvent inversement proportionnelle à la qualité du prétraitement de l'échantillon avant l'extraction. C'est pourquoi il est important de bien laver ce dernier avec de l'eau contenant un inhibiteur de protéase avant de débiter l'extraction. De plus, une concentration de collagène trop élevée peut aussi rendre la centrifugation des débris difficile. Dans ce cas, la solution de collagène doit être diluée afin de permettre la mise en culot des impuretés contenues dans la solution de collagène solubilisé (Miller and Rhodes 1982).

Dans tous les cas, après la solubilisation du collagène et la clarification de la solution par ultracentrifugation, le collagène extrait doit être purifié. Pour ce faire, le collagène est précipité par l'ajout de NaCl et/ou par dialyse. La méthode et la concentration de sel utilisées dépendent de la solution avec laquelle le collagène a été extrait. Le collagène solubilisé dans une solution de sels neutres est précipité en augmentant la concentration de NaCl à 4,0 M ou en dialysant la solution de collagène afin d'abaisser la force ionique de la solution (Gross, Highberger et al. 1955; Miller and Rhodes 1982). Pour ce qui est du collagène solubilisé dans une solution acide avec ou sans protéase, ce dernier est précipité en ajoutant du NaCl jusqu'à une concentration de 2,0 M. Dans les deux cas la solution de collagène est laissée à précipiter pendant 12 à 24 heures sans agitation afin de permettre une récupération optimale du collagène. Le précipité peut ensuite être centrifugé à 35 000 g pendant 1 heure. Le culot de collagène ainsi recueilli peut alors être solubilisé à nouveau dans une solution d'acide acétique de 0,5 M à la concentration désirée, souvent 1 mg/ml (Miller and Rhodes 1982). Plusieurs autres techniques de précipitation et de purification du collagène existent, telles que la précipitation par ajout de NaOH, d'EDTA et de solvants organiques tels que l'éthanol et l'acétone (Steven F. S. 1961; Steven 1964; Steven and Jackson 1967). Cependant, c'est la méthode utilisant la précipitation par augmentation de la concentration en sel qui est la plus utilisée. En effet, cette dernière est beaucoup plus simple et garde le collagène dans sa conformation native. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le sel qui peut se retrouver dans le précipité est aisément enlevé par dialyse après resolubilisation du collagène dans une solution acide (Miller and Rhodes 1982).

1.4.4 Les biomatériaux à base de collagène

L'utilisation la plus simple du collagène comme biomatériau est l'éponge de collagène lyophilisé pour le revêtement temporaire de plaie. Son utilisation et son succès proviennent, entre autres, de son efficacité d'absorption comparativement aux matériaux utilisés dans le soin des plaies, mais aussi de son action en tant qu'agent chemoattractant pour les cellules inflammatoires. De plus, le changement de l'éponge tous les 2 à 3 jours

permet d'enlever les cellules indésirables du lit de la plaie (Chvapil 1982; Arem 1985). Par ailleurs, il a été démontré que les collagènes de types I, II et III ainsi que leurs produits de dégradation favorisent la migration des fibroblastes dermiques humains *in vitro* (Postlethwaite, Seyer et al. 1978). Cette éponge peut aussi être utilisée avec des additifs comme l'alginate. Ce genre de recouvrements temporaires de plaie, comme FIBRACOL™, permet une réduction du temps de cicatrisation en comparaison avec l'utilisation conventionnelle de gazes (Donaghue, Chrzan et al. 1998; Van Gils, Roeder et al. 1998). Comme mentionné précédemment, l'utilisation du collagène sous forme d'hydrogel pour le recouvrement temporaire des plaies s'est aussi avérée très efficace (Burd 2007).

Cependant, la majeure partie des biomatériaux à base de collagène sont produits en stabilisant ce dernier par polymérisation avec des additifs comme la chondroïtine-6-sulfate (Boyce, Christianson et al. 1988; Yannas, Lee et al. 1989). Plusieurs méthodes pour réticuler le collagène, afin de stabiliser sa structure, ont été découvertes et testées au cours des dernières décennies. Toutes ces méthodes de stabilisation sont cependant réalisées après la détermination de la taille des pores du biomatériau par lyophilisation. Les méthodes physiques incluent la réticularisation par irradiation UV, par déshydratation ou par traitement thermique (Weadock, Olson et al. 1983; Lew, Liu et al. 2007). Les méthodes chimiques quant à elles comprennent, entre autres, l'utilisation de glutaraldéhyde (Weadock, Olson et al. 1983; Boyce, Christianson et al. 1988; Murphy, Orgill et al. 1990) et de polyéthylène glycol (PEG) (Doillon, Cote et al. 1994) après lyophilisation également, car c'est cette étape qui détermine la taille des pores du biomatériau. Certains de ces biomatériaux à base de collagène réticulé se sont avérés comparables aux greffes de peau autologues dans plusieurs cas de brûlures profondes (Boyce, Goretsky et al. 1995). Cependant, le glutaraldéhyde étant très toxique, les éponges consolidées à l'aide de ce produit sont donc un effet cytotoxique dû au relâchement de celui-ci au fil du temps (Speer, Chvapil et al. 1980). La toxicité des agents chimiques utilisés pour la stabilisation du collagène est la principale raison pour laquelle les biomatériaux utilisés cliniquement sont idéalement réticulés selon les méthodes physiques (Boyce, Christianson et al. 1988). Néanmoins, le collagène peut aussi être réticulé par mélange avec le chitosane avant l'étape de lyophilisation. Cette molécule fortement chargée permet la création de liaisons

ioniques entre les groupements carboxyles libres du collagène, chargés négativement, et les groupements amines des unités glucosamines du chitosane, chargés positivement. Le ratio de liaisons créées est proportionnel au taux de déacétylation du chitosane, soit au nombre de groupements amines libres à la surface de ce polysaccharide (Shahabeddin, Berthod et al. 1990; Saintigny, Bonnard et al. 1993; Berthod, Saintigny et al. 1994; Damour, Gueugniaud et al. 1994).

1.5 Le chitosane

1.5.1 Historique

Le chitosane est un produit dérivé de la chitine produit par déacétylation comme illustré à la figure 13. C'est un polysaccharide dont le monomère est la glucosamine, un glucose ayant une chaîne latérale aminée (Campbell, Reece et al. 1995). La chitine est principalement extraite de l'exosquelette des arthropodes. Ce biopolymère constitue l'un des plus abondants de la Terre avec la cellulose (Alberts, Johnson et al. 2002). Beaucoup d'études ont été faites sur les multiples utilisations du chitosane des années 1950 à 1970 que ce soit comme colorant en histologie (Yasuda 1953), comme antiacide ou anticoagulant expérimentaux en biologie (Hillyard, Doczi et al. 1964; Whistler and Kosik 1971), comme support chromatographique en chimie organique (Muzzarelli and Tubertini 1969; Nagasawa, Watanabe et al. 1970; Muzzarelli and Sipos 1971; Muzzareli, Ferrero et al. 1972) ou comme inhibiteur de fermentation en biochimie (Ralston, Tracey et al. 1964). Cependant, c'est dans les années 70-80 que ce dernier a été précisément caractérisé et que des applications biomédicales ont été envisagées. Des méthodes pour évaluer la quantité et la qualité du chitosane ont été développées (Wu, Bough et al. 1976; Chang and Hash 1979; Muzzarelli, Tanfani et al. 1980). Son potentiel de modification chimique, de formation de gel ainsi que l'optimisation de son extraction ont aussi été approfondis (Hirano, Ohe et al. 1976; White, Farina et al. 1979; Hirano, Tobetto et al. 1980; Hirano, Tobetto et al. 1981).

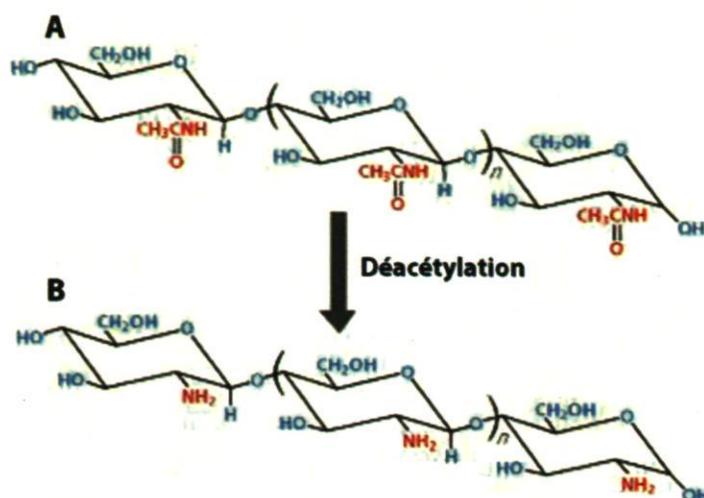


Figure 13: Visualisation de la formule chimique de la chitine (A) et du chitosane (B) (modifiée de <http://www.altakitin.com/>).

À partir des années 80, la chitine et son principal dérivé, le chitosane, sont devenus des sujets d'étude importants dans divers domaines. Ces études ont mené à des applications multiples que ce soit pour le traitement des eaux usées, dans l'industrie des pâtes et papiers, dans celle des cosmétiques ainsi que dans les domaines alimentaire et biomédical (Q. Li, Grandmaison et al. 1992; Shigemasa and Minami 1995; Hayes, Carney et al. 2008).

Pour ce qui est du domaine biomédical, les principales applications du chitosane sont le recouvrement de plaies et/ou la mise au point de substituts cutanés (Saintigny, Bonnard et al. 1993; Berthod, Saintigny et al. 1994; Damour, Gueugniaud et al. 1994; Mi, Shyu et al. 2001; Azad, Sermsintham et al. 2004; Boucard, Viton et al. 2007; Kiyozumi, Kanatani et al. 2007; Alsarra 2009), la production de différents supports servant à la régénération nerveuse (Gingras, Paradis et al. 2003; Freier, Montenegro et al. 2005), chondrale (Griffon, Sedighi et al. 2006; Yan, Qi et al. 2007; Jin, Moreira Teixeira et al. 2009; Ragety, Slavik et al. 2009) et osseuse (Ito 1991; Klokkevold, Vandemark et al. 1996; Pound, Green et al. 2006) ainsi que la libération graduelle de différents agents actifs, tels que des antibiotiques et des facteurs de croissance (Cai, Zeng et al. 2007; Xiaoyan, Jun et al. 2008; Alsarra, Hamed et al. 2009).

1.5.2 Méthodes d'extraction

L'extraction de la chitine et ensuite sa transformation en chitosane, par déacétylation, peut se faire à partir de deux sources distinctes. Premièrement, les résidus de crustacés qui sont la principale source de chitine et deuxièmement les parois cellulaires de mycètes comme *Mucor rouxii*, desquelles ce polysaccharide peut aussi être extrait (White, Farina et al. 1979; Roberts 1992; Domard, Roberts et al. 1997; Synowiecki and Al-Khateeb 1997; Synowiecki and Al-Khateeb 2000; Chatterjee, Adhya et al. 2005).

La production de chitosane à partir de carapaces de crabes ou de crevettes commence par l'extraction de la chitine de ces résidus de l'industrie alimentaire. En premier lieu, les carapaces de ces crustacés doivent être déminéralisées par un traitement à l'acide chlorhydrique à une concentration de 1 à 10 % (m/v) pendant une à trois heures à température ambiante selon un ratio carapaces acides de 1 : 20 (Hackman and Goldberg 1965; Shahidi and Synowiecki 1991; Synowiecki and Al-Khateeb 2000). Le point le plus important pour avoir une déminéralisation complète est de s'assurer que l'acide est en excès dans la réaction stœchiométrique. La prolongation du temps de déminéralisation au-delà de trois heures avec un acide plus faible est à proscrire, car cela peut entraîner la dégradation de la chitine (Domard, Roberts et al. 1997). Ensuite, les résidus déminéralisés sont déprotéinés à l'aide d'hydroxyde de potassium ou de sodium (KOH, NaOH). L'efficacité de la déprotéinisation est dépendante de la température à laquelle se produit la réaction, de la concentration de la base et du ratio de la quantité résidus versus la quantité de bases en solution. Normalement, les résidus sont traités avec du NaOH ou du KOH à une concentration comprise entre 1 et 10 % (m/v) et à des températures oscillant entre 60 et 100°C. Les conditions optimales seraient 90°C, environ 2 % (m/v) d'acide à un ratio carapaces : base de 1 : 20 pendant 30 minutes à 6 heures. Le facteur temps est très important, car c'est lui qui détermine la longueur du polymère de chitine récupéré et son taux de déacétylation (Shahidi and Synowiecki 1991; Synowiecki and Al-Khateeb 2000). Cette technique a été récemment optimisée enzymatiquement par l'ajout d'alcalase, enzyme disponible commercialement, à la solution basique initiale. Ceci permet l'extraction d'une partie des acides aminés essentiels libérés lors de cette étape de

déprotéinisation. Une étape d'inactivation de l'enzyme avec du HCl 4 M doit cependant être ajoutée au protocole avant la centrifugation de 15 minutes à 4000 g. Ensuite, les protéines et acides aminés précipités sont recueillis dans le culot et purifiés pour générer un produit à valeur ajoutée et ainsi rentabiliser l'extraction. De plus, cette étape a aussi comme effet de réduire la quantité de matière organique relâchée dans les eaux usées des industries produisant de la chitine. Cela réduit encore plus les coûts de production liés aux traitements de ces rejets industriels. La chitine est quant à elle lavée successivement à l'eau, à l'éthanol et à l'acétone avant d'être séchée (Shahidi and Synowiecki 1991; Synowiecki and Al-Khateeb 2000).

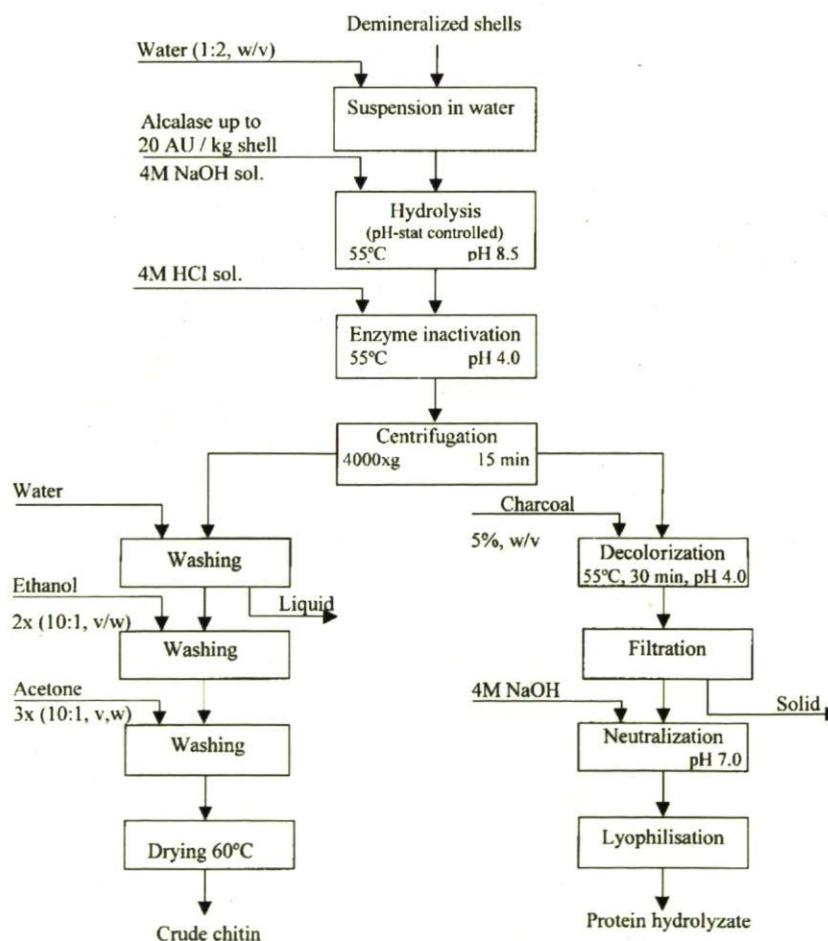


Figure 14: Diagramme d'extraction de la chitine des carapaces de crustacés (modifiée de (Synowiecki and Al-Khateeb 2000)).

Pour la production de chitosane à partir de mycètes tels que *Mucor rouxii*, ces derniers sont cultivés dans du milieu contenant glucose (2 %), peptone (1 %) et extrait de levure (0,2 %) à 28°C avec agitation. Lorsqu'il y a assez de mycélium, ce dernier est récupéré et lavé par filtration sous vide. Le produit ainsi obtenu est lyophilisé et ne nécessite aucune déminéralisation. Les protéines sont éliminées dans le surnageant de centrifugation suivant un traitement au KOH 2 % pendant 2h à 90°C selon un ratio (m/v) de 1 : 30. Après cette déprotéinisation, le chitosane contenu dans le culot est solubilisé par reflux avec une solution d'acide acétique à 10 % à une température de 60°C pendant 6 heures selon un ratio (m/v) de 1 : 40. La phase liquide est récupérée par centrifugation et le chitosane est obtenu par précipitation en condition basique (pH = 9,0). La chitine contenue dans le culot de l'étape précédente ainsi que le chitosane précipité et culotté, sont chacun lavés séquentiellement à l'eau, à l'éthanol et à l'acétone avant d'être séchés (Synowiecki and Al-Khateeb 1997).

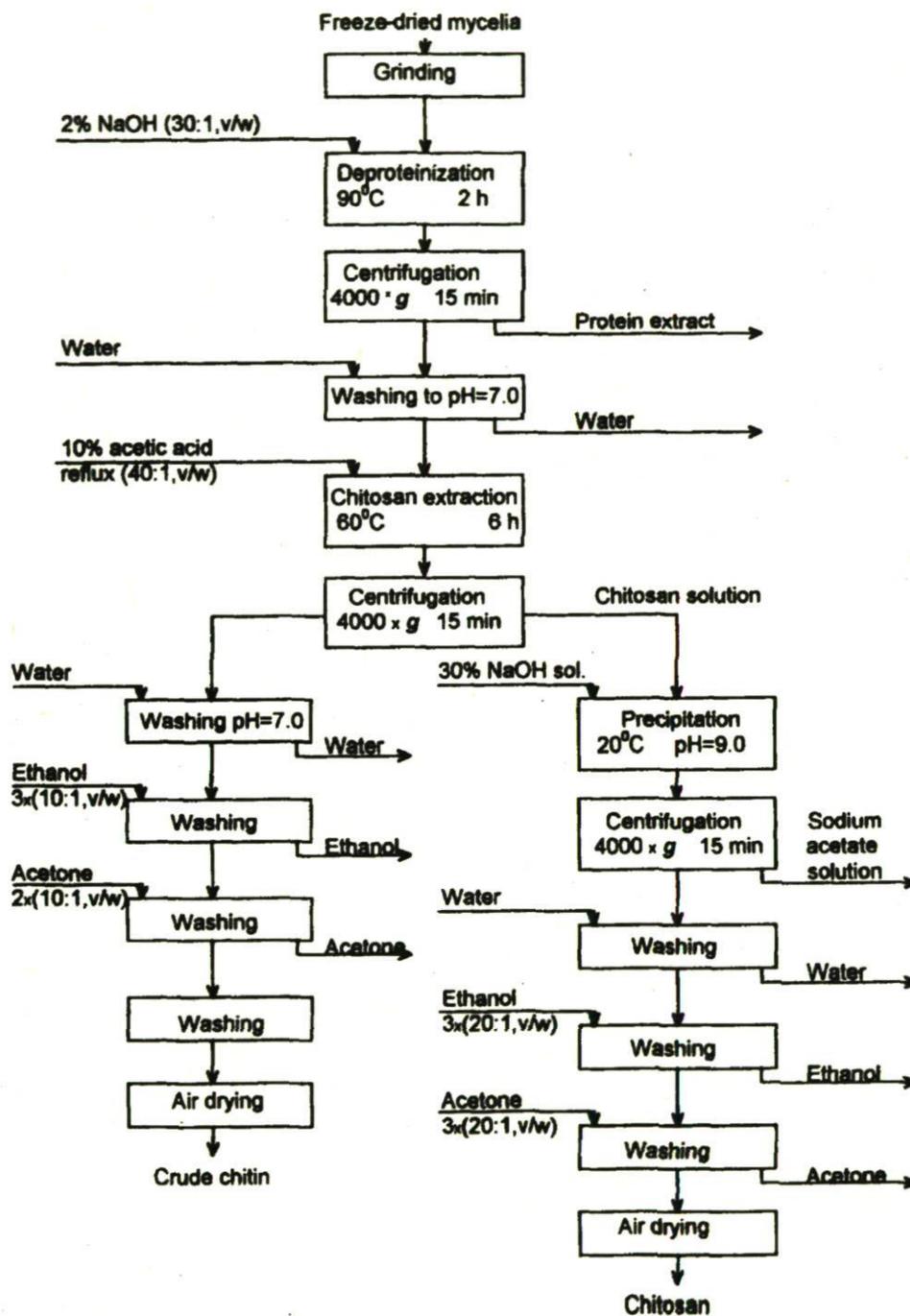


Figure 15: Diagramme d'extraction du chitosane à partir de *Mucor rouxii* (modifiée de (Synowiecki and Al-Khateeb 1997)).

Les avantages de la production de chitosane à partir des *fungi* résident dans le fait qu'une partie de l'extraction produit directement du chitosane et que la matière première ne nécessite aucune déminéralisation. Cependant, la production de chitosane utilisant les résidus de crustacés de l'industrie alimentaire présente quant à elle une grande disponibilité de matière première, d'où une bonne rentabilisation. Cela permet ainsi d'éviter la dégradation de cette biomasse dans la nature qui, sinon, eutrophierait l'environnement. Il s'agit donc d'un bon compromis.

Néanmoins, dans les deux cas, la chitine obtenue doit être traitée avec une solution basique, souvent du NaOH, pour induire sa déacétylation et ainsi produire du chitosane. La réaction de N-déacétylation de la chitine pour l'obtention du chitosane se fait à des températures entre 80 et 140 °C dans une solution très concentrée de NaOH soit de 30 à 60 % (m/v), et ce, pour une durée allant jusqu'à 10 heures (Muzzarelli 1977; Roberts 1992). C'est la variation de ces trois paramètres : température, temps et concentration de base, qui détermine à la fois le taux de déacétylation, la distribution des poids moléculaires des fragments produits et la répartition des sites de déacétylation sur les chaînes de polysaccharides produites (Domard, Roberts et al. 1997). Le contrôle des paramètres de déacétylation est primordial dans la production de chitosane, car c'est la combinaison de ces trois facteurs structuraux qui détermine les différentes propriétés qu'aura le chitosane produit. Avec les paramètres mentionnés ci-dessus, le taux de déacétylation atteint tend à plafonner vers 78 %, après quoi il commence à y avoir une dégradation significative de la molécule de polysaccharide. Cette dégradation est aussi augmentée par la présence d'oxygène lors de la réaction de déacétylation. Pour minimiser la dégradation du polysaccharide, la réaction peut être réalisée sous atmosphère d'azote (Bough, Salter et al. 1978). Pour accomplir une déacétylation du chitosane supérieure à 90 %, il faut employer un protocole particulier. Le chitosane doit tout d'abord être incubé à 4°C dans une solution de NaOH concentrée à 50 % (m/v) pendant 24 heures, ensuite il est extrait de cette solution et remis dans un autre contenant du NaOH cette fois-ci concentré à 10 % (m/v). Il est finalement chauffé à 230°C avant d'être brusquement refroidi (Domard, Roberts et al. 1997).

Étant donné la variabilité des méthodes de production du chitosane et les répercussions de chacune d'elles sur les propriétés du produit fini, il est primordial de standardiser tout le processus d'extraction et de contrôler la qualité lors de la production du chitosane. Les principales caractéristiques qui doivent être contrôlées pour ce polysaccharide sont : le ratio entre les résidus glucosamine et N-acétyl glucosamine (GlcNac) soit le taux de déacétylation, leur répartition sur la chaîne polysaccharidique, la longueur moyenne des fragments produits et le poids moléculaire moyen de ces derniers. Il est aussi essentiel, pour la production de produits biomédicaux, de répondre à certains critères de pureté. Parmi ceux-ci il y a le contenu en protéines et en endotoxines (devant être inférieur à 5 EU/kg de poids corporel pour la mise au point de biomatériaux implantables), la concentration en métaux lourds et la présence de résidus microbiologiques (bactéries, levures et moisissures) (Dornish, Kaplan et al. 2001).

1.5.3 Biodégradation, biocompatibilité et biofonctionnalité

Grâce à sa structure chimique, le chitosane est un polymère hautement biocompatible et biodégradable. Ceci s'explique par la structure de ce polysaccharide qui est composé d'unités GlcNac et glucosamine qui sont omniprésents dans l'organisme. Ces dérivés du glucose sont utilisés lors des processus de glycosylation des protéines et de formation des protéoglycans, modifications post-traductionnelles essentielles au bon fonctionnement de toutes nos cellules (Alberts, Johnson et al. 2002). Les dérivés de la glucosamine sont aussi utilisés pour la formation de glycoaminoglycans servant entre autres d'éléments structuraux dans nos cellules. Ces unités de base utilisées par la majorité des cellules de l'organisme sont aisément obtenues par la dégradation du chitosane principalement par le lysozyme cellulaire (Varum, Myhr et al. 1997), mais aussi par d'autres enzymes présentes dans l'organisme telles que la N-acétyl glucosaminidase et les chitinases (Hirano, Tsuchida et al. 1989; Muzzarelli 1993; Muzzarelli 1997).

De plus, le chitosane possède plusieurs autres caractéristiques qui font de ce polysaccharide un élément très intéressant pour la mise au point de biomatériaux. Tout

d'abord, son potentiel immunostimulant comprend des propriétés antibactériennes, anti-tumorales ainsi qu'antivirales. Ces effets sur le système immunitaire sont principalement dus à l'activation de macrophages et de cellules NK ainsi qu'à la libération de cytokines pro-inflammatoires, donc à l'augmentation du nombre circulant de cellules impliquées dans l'immunité cellulaire (Nishimura, Nishimura et al. 1984; Suzuki, Okawa et al. 1984; Nishimura, Nishi et al. 1986; Iida, Une et al. 1987).

Certaines études semblent démontrer que la présence de chitine dans l'organisme provoque des réactions du système immunitaire qui sont spécifiques à la taille des fragments ainsi qu'au ratio chitine versus chitosane. L'hypothèse avancée est que les fragments de grandes tailles seraient jugés inertes par l'organisme, alors que ceux d'une longueur intermédiaire, de 40 à 70 μm de long, engendreraient une réponse immunitaire. Cette dernière proviendrait du mécanisme de défense anti-parasitaire car les fragments de chitine s'apparenteraient aux débris produits par les macrophages lors de la destruction de pathogènes. La présence de ces fragments spécifiques, appelés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), libèrerait des cytokines pro-inflammatoires recrutes de macrophages. De plus, les fragments de tailles inférieures, 40 μm et moins, produiraient quant à eux des signaux anti-inflammatoires, témoignant de la destruction complète des pathogènes présents (Da Silva, Hartl et al. 2008; Lee, Da Silva et al. 2008).

Ces propriétés immunomodulatrices de la chitine et du chitosane font donc de ces biopolymères des produits de choix pour la mise au point de biomatériaux.

CHAPITRE II - PROBLÉMATIQUE

Chapitre II - Problématique

La problématique du collagène bovin et l'origine de cette étude

Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel des collagènes porcins et aviaires pour la fabrication d'un biomatériau à base de collagène et de chitosane. L'intérêt d'évaluer ces deux sources de collagène comparativement au collagène bovin, utilisé par notre équipe depuis des années, vient principalement de la problématique des prions entourant les productions bovines. Contrairement aux bactéries et à la plupart des virus, les prions sont des pathogènes difficilement éliminables par les méthodes conventionnelles de stérilisation (Hodde and Hiles 2002). Sachant maintenant que la manifestation d'une telle infection peut prendre jusqu'à plusieurs années d'incubation, l'utilisation du collagène bovin est de moins en moins populaire pour la production de produits biomédicaux. (Goldfarb and Brown 1995; Collinge 2001). Le principal avantage des collagènes porcins et aviaires est qu'ils sont exempts de prions.

De plus, il est important de mentionner que cette étude est le fruit d'un partenariat public-privé entre notre équipe, Agriculture et Agroalimentaire Canada ainsi qu'Olymel. Cette collaboration résulte de l'intérêt toujours croissant des compagnies et des organismes gouvernementaux pour l'optimisation des biomasses résiduelles. Dans ce cas-ci, la rentabilisation des résidus de production alimentaire des industries avicoles et porcines est la raison pour laquelle nous avons été approchés. Leur but étant de vérifier si les collagènes porcins et aviaires peuvent avoir des applications biotechnologiques. Notre rôle est de procéder à l'évaluation du potentiel des collagènes extraits, par Simon Cliche et le Dr Claude Gariépy d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, à partir des peaux de porcs et de poulets étant des résidus de production alimentaire d'Olymel.

Pour ce faire, nous avons produit des éponges de collagène et de chitosane, par lyophilisation, en utilisant la même solution de chitosane pour les trois solutions de collagène de sources différentes. Les biomatériaux ainsi produits ont été analysés par

microscopie électronique à balayage, pour déterminer la taille et la distribution de leurs pores. Ensuite, des fibroblastes dermiques humains ont été cultivés sur ces biopolymères réhydratés et stérilisés. Des tests mécaniques, histologiques et immunohistochimiques ont ensuite été faits à différents temps de culture. Finalement, les surnageants de culture, prélevés à différents intervalles de temps, ont été analysés afin de vérifier la cytotoxicité des substrats et l'activité des métalloprotéinases remodelant la matrice de l'éponge.

CHAPITRE III - MATÉRIEL & MÉTHODES

Chapitre III – Matériel & Méthodes

3.1 Isolement de fibroblastes dermiques humains

Les fibroblastes dermiques humains sont extraits à partir d'une biopsie de peau provenant d'excédents cutanés obtenus lors de chirurgies esthétiques. Lors de la réception de la peau, sa superficie est tout d'abord estimée et épurée du gras qu'elle peut contenir. Elle est ensuite lavée vigoureusement par inversion avec du PBS culture 1X contenant 100 U/ml Penicilline G (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), 25 µg/ml de gentamicine (Schering, Pointe-Claire, Canada) et 0,5 µg/ml de fungizone (Sigma-Aldrich). Par la suite, toutes les manipulations sont effectuées en conditions stériles. Une solution de thermolysine à 500 µg/ml (Sigma-Aldrich) est préparée dans de l'HEPES 1X (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA), à raison de 10 ml par portion de 20 cm² de superficie peau précédemment estimée. La peau est alors découpée en morceaux de 3 mm par 5 mm et incubée à 4°C environ 16 heures dans des pétris de 60 mm avec 10 ml de solution de thermolysine, selon le ratio volume surface prédéterminé. Après incubation, l'épiderme est séparé du derme à l'aide de pince. Le derme est mis dans une unité de trypsination avec 20 ml de collagénase H (Roche Diagnostics, Laval, Canada) à 0,0125 U/ml et incubé à 37°C pendant environ 20 heures. La suspension cellulaire est alors récupérée avec 40 ml de DMEM 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml de pénicilline G (Sigma-Aldrich) et 25 µg/ml de gentamicine (Schering) et centrifugée à 300 g. Les culots sont ressuspendus dans du DMEM 10 % SVF (DMEc) et les cellules sontensemencées dans des flacons de 75 cm² (BD Biosciences, Mississauga, Canada) à raison de 2 à 3 millions de cellules par flacon et incubées à 37°C dans 8 % de CO₂. Les milieux de culture sont par la suite changés trois fois par semaine à raison de 15 ml par flacon de DMEc.

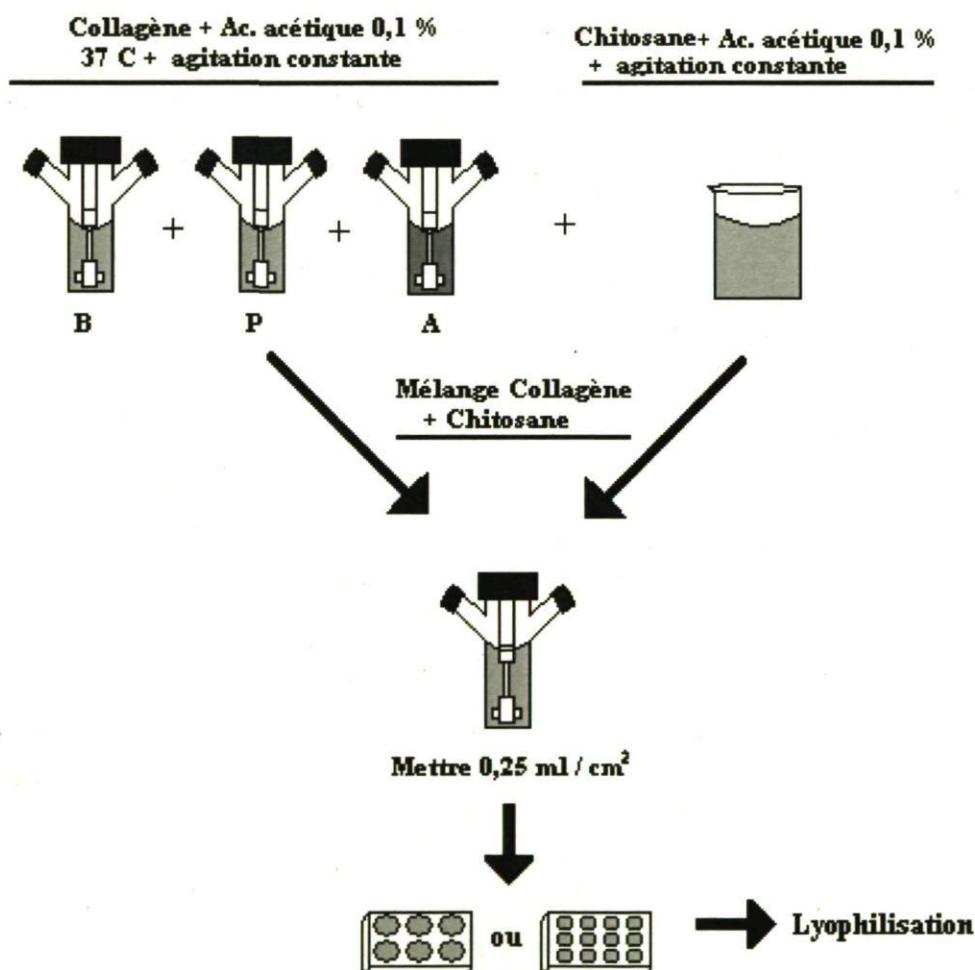
3.2 Production des éponges de collagène-chitosane

Les éponges de collagène-chitosane sont produites selon le protocole du LOEX avec du collagène bovin I-III obtenu par extraction acide (Symatase, Chaponost, France) et du chitosane déacétylé à environ 90 % (Kemestrie Inc., Sherbrooke, Canada). Les collagènes sont solubilisés dans de l'acide acétique glacial 0,1 % (EMD Biosciences, Inc., Madison, WI) à 37°C avec agitation. Le chitosane est lui aussi solubilisé dans l'acide acétique glacial 0,1 % avec des ajouts goutte à goutte d'acide acétique glacial pur afin d'aider sa solubilisation. Après la solubilisation des collagènes et du chitosane, ce dernier est ajouté en quantité égale à toutes les solutions de collagène. Lorsque les mélanges sont homogènes, de l'eau apyrogène est ajoutée afin d'obtenir le volume désiré. Après homogénéisation, les mélanges sont distribués dans des plaques 6 puits (BD Biosciences) à raison de 2,5 ml par puits. Ces plaques sont ensuite lyophilisées pendant 48 heures à l'aide d'un programme préétabli dans un lyophilisateur Dura-Stop™ de FTS Systems (Kynetics Thermal Systems, Stone Ridge, NY). Les figures 16 et 17 permettent respectivement la visualisation du processus production des éponges et leur apparence micro et macroscopique. Ces éponges sont ensuite réhydratées et stérilisées avec un trempage de 48-72 heures dans l'isopropanol 70 %, une journée dans du milieu de culture DMEM (Invitrogen, Burlington, Canada) avec 300 U/ml pénicilline G (Sigma-Aldrich) 75 µg/ml de gentamicine (Schering) et 1,5 µg/ml de fungizone (Sigma-Aldrich) pour ensuite tremper une journée dans du DME à 37 °C, afin de vérifier s'il y a présence de contamination microbiologique. Ce processus de stérilisation est schématisé à la figure 18.

Dans le cadre de cette expérience, les deux collagènes testés, porcine et aviaire, ont été préparés par Simon Cliche et Claude Gariépy, Ph. D., nos collaborateurs chez Agriculture et Agroalimentaire Canada. Brièvement, la peau de porc ou de poulet a été réduite en particules (0,5 mm²) à l'aide d'un hachoir. Les fractions solide et liquides (eau et matière grasse) ont ensuite été séparées avec un décanteur par centrifugation. La fraction solide a ensuite été utilisée pour la solubilisation du collagène par homogénéisation dans de l'acide acétique 0,5 M, pH 2,80 à un ratio de 1 : 8 (fraction solide : acide acétique)

pendant 72 heures. Le collagène soluble a finalement été récupéré par filtration et/ou centrifugation avant d'être lyophilisé.

Comme le décrit le schéma de la figure 16, les trois collagènes de sources différentes ont été préparés de la même façon et en même temps pour chaque lot d'expérience.



© Rémi Parenteau 2009

Figure 16: Schéma de préparation du biopolymère de collagène et de chitosane avec les trois sources de collagène soit : bovin (B), porcine (P) et aviaire (A).

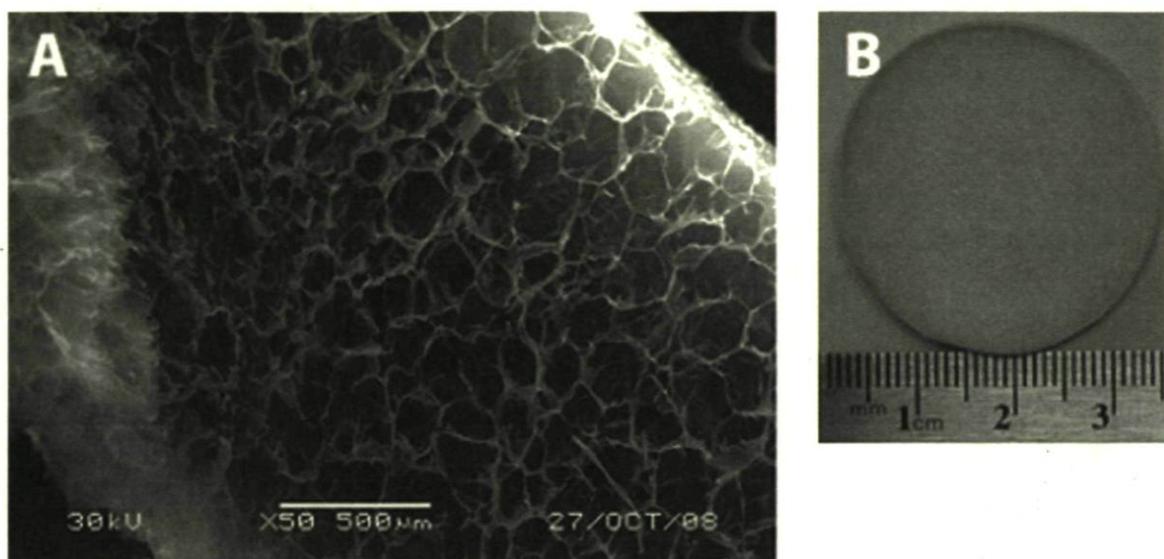


Figure 17: Visualisation de la structure microscopique (A) et macroscopique (B) du biomatériau de collagène et de chitosane.

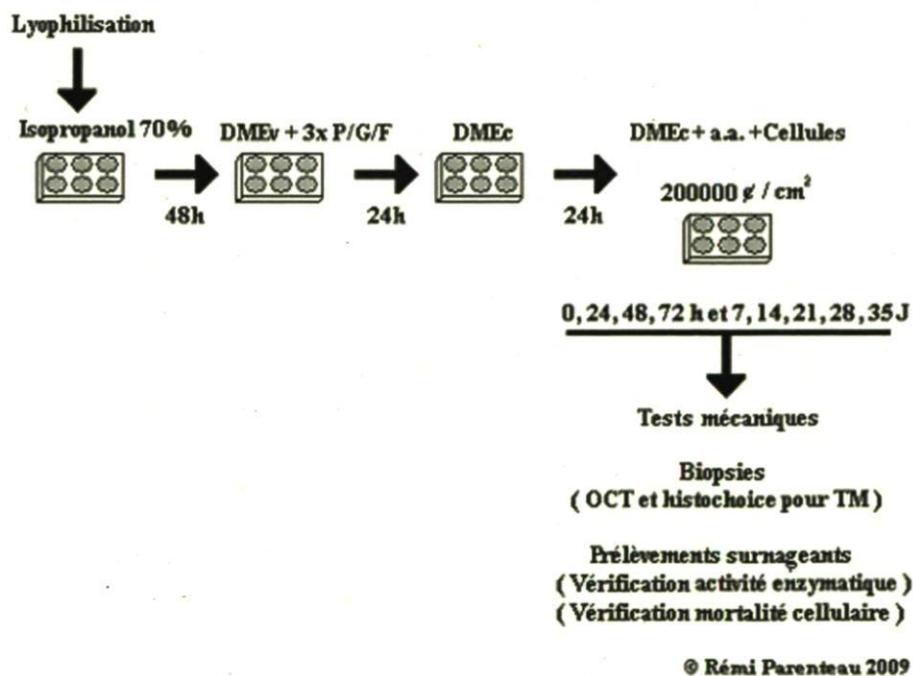


Figure 18: Procédure de stérilisation des éponges et processus expérimental.

3.3 Ensemencement et culture des éponges

Chaque éponge dans chaque puits d'une plaque 6 puits estensemencée avec 2 millions de fibroblastes dermiques humains dans un volume de 300 µl de DMEc avec 100 µg/ml d'acide ascorbique (Sigma-Aldrich). Ce volume est déposé au centre de l'éponge goutte à goutte. Au moins 2 heures plus tard, 4 ml de DMEc sont ajoutés délicatement, le long de la paroi de chaque puits. Le milieu, contenant de l'acide ascorbique fraîchement préparé, est changé trois fois par semaine. Les surnageants de culture sont prélevés à des intervalles de culture de 24, 48 et 72 heures ainsi qu'à 7, 14, 21, 28 et 35 jours de culture. Chaque prélèvement est congelé à -80°C jusqu'à son utilisation pour déterminer l'activité des métalloprotéinases et la mortalité cellulaire. À chacun de ces intervalles de temps, des biopsies d'éponge sont aussi prélevées afin de pouvoir effectuer des analyses histologiques et immunohistochimiques. Pour ce qui est de l'histologie, les éponges sont fixées dans une solution d'HISTOCHOICE™ (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) avant d'être paraffinées, coupées et colorées au trichrome de Masson (TM).

3.4 Immunofluorescence afin de visualiser la MEC produite

Les biopsies effectuées sur les éponges préparées sont enrobées dans une solution d'OCT (Sukura, Finetek U.S.A. Inc., Torrance, CA), puis congelées à -80°C. Des coupes de 10 µm d'épaisseur sont produites avec un cryostat Leica CM3050 (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL), pour les analyses en microscopie à fluorescence. Ces coupes sont d'abord fixées dans une solution de PBS contenant 3,7% (v/v) de formol (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) et perméabilisées avec une solution de méthanol 100% (Fisher Scientific). Les coupes sont ensuite lavées dans du PBS à immunofluorescence (IF), contenant du CaCl₂, et incubées avec les solutions d'anticorps appropriées. L'anticorps primaire, AcP de lapin (IgG) anti-décorine humaine (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE) dilution 1/200, a été ajouté à raison de 50 µl par coupe et incubé 45 minutes à température ambiante. Trois lavages au PBS IF sont ensuite effectués. L'anticorps

secondaire, Ac de chèvre anti-IgG de lapin couplé avec Alexa 488 (Invitrogen) dilution 1/800, est ajouté à 50 μ l par coupe et incubé 30 minutes. Deux lavages au PBS IF et un à l'eau apyrogène sont ensuite effectués. Un marquage des noyaux cellulaires est alors obtenu par une incubation de 10 minutes de chaque coupe dans une solution de 50 μ l de Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) à une dilution 1/100. Les contrôles négatifs des immunomarquages sont obtenus par omission du premier anticorps. Les coupes sont visualisées avec un microscope à épifluorescence Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokyo, Japon) puis les photos sont assemblées dans le logiciel Adobe® Photoshop® CS2 (Adobe, San Jose, CA). Ceci permettant la visualisation des noyaux cellulaires au sein des éponges ainsi que la possibilité de bien situer la MEC produite par les cellules via le marquage de la décorine.

3.5 Analyse par microscopie électronique à balayage

Les éponges produites par lyophilisation avec les différentes sources de collagène ont été coupées en petits cubes de 5 mm par 5 mm avec une lame de scalpel #22 (Personna Medical, Verona, VA) et envoyées au service de microscopie de l'Université Laval pour être préparées. Chaque échantillon est ensuite observé avec un microscope électronique à balayage JEOL JSM6360LV (JEOL, Tokyo, Japan).

Les pores, visibles en premier plan sur les images ainsi obtenues, sont tracés avec l'outil "Polygon selections" du logiciel Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). La taille et la circularité des pores produits sont alors déterminées par analyse avec ce même logiciel pour chaque biomatériau. La circularité est une valeur de 0 à 1 selon laquelle la forme tracée se rapproche le plus d'un cercle parfait (1) ou d'une ligne (0).

3.6 Détermination de l'activité des métalloprotéinases

La détermination de l'activité totale des métalloprotéinases présentes dans les surnageants de culture est effectuée à l'aide d'une trousse SensoLyte™ 520 Generic MMP Assay Kit (Anaspec, San Jose, CA). Cette trousse détecte simultanément l'activité des MMP-1, 2, 7, 8, 9, 12, 13 et 14. Les résultats de ce test représentent l'activité de ces MMP en présence des inhibiteurs de métalloprotéinases pouvant être présents dans les surnageants de culture. Les valeurs de fluorescence sont obtenues grâce à un fluorimètre Varioskan Flash (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC) réglé à une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et captant l'émission de fluorescence à 520 nm. Les procédures expérimentales sont effectuées selon les instructions fournies par le fabricant.

3.7 Détermination du taux de mortalité cellulaire

La comparaison des taux de mortalité cellulaire entre les différents échantillons est effectuée en utilisant la trousse Toxylight® BioAssay Kit (Lonza, Rockland, ME). La toxicité est évaluée en fonction de la quantité d'adénylate kinase (AK) libérée. Lorsque l'intégrité de la membrane d'une cellule est altérée, il y a libération d'AK dans le milieu. Cette enzyme phosphoryle l'ADP des réactifs de détection en ATP. L'ATP et la luciférine sont ensuite utilisées par la luciférase pour produire, entre autres, de la lumière. Les valeurs de luminescence sont alors obtenues grâce à un luminomètre Orion II Microplate Luminometer (Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Germany). Les procédures expérimentales sont effectuées selon les instructions fournies par le fabricant.

3.8 Tests mécaniques

Les propriétés mécaniques des dermes reconstruits sont déterminées à partir d'essais de traction simple, effectués à l'aide d'un appareil de traction (Tytron™ 250 MicroForce Testing System, MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MN). Cet appareil

permet d'appliquer une contrainte en tension sur les tissus à une vitesse de 0.2mm/s, tout en faisant l'acquisition des contraintes et des déformations induites dans les tissus.

On utilise des sections de tissus préparées selon la norme ASTM D-638, que l'on place entre deux ancrages servant à fixer l'échantillon à l'appareil de traction. Un de ces ancrages est fixe, et est relié à une cellule de force qui enregistre la contrainte dans le tissu. L'autre ancrage est mobile et se déplace à vitesse constante (0,2 mm/s) afin d'induire une déformation constante dans le tissu.

L'essai de traction simple consiste à déformer le tissu jusqu'à l'obtention d'une tension appliquée assez élevée pour assurer la rupture de celui-ci. Ce type d'essai permet de mesurer la résistance, le module d'élasticité et la déformation à la rupture du tissu. L'acquisition des données de force appliquée (en Newtons) et de déplacement de l'actuateur (en millimètres) effectuée par le biais d'un ordinateur tout au long de l'essai permet de tracer la courbe de la force en fonction du déplacement dans le tissu. On mesure ensuite l'épaisseur de l'échantillon sur une coupe histologique afin de convertir les contraintes mesurées en Newtons, en des valeurs de contrainte exprimées en unités de pression ($\text{N/mm}^2 = \text{MPa}$). Cette conversion permet de pouvoir ensuite comparer les différents types d'échantillons entre eux, puisque les valeurs exprimées en MPa tiennent compte de l'aire transversale du tissu, sur laquelle la contrainte est appliquée. On transforme également les données de déplacement enregistrées pour l'actuateur en pourcentage de déformation du tissu en basant la conversion sur les dimensions initiales des échantillons testés. La résistance du tissu est représentée par le niveau de contrainte le plus élevé enregistré avant la rupture du tissu. Le module d'élasticité est déterminé par le calcul de la pente de la partie linéaire de la courbe de la contrainte en fonction de la déformation de l'essai de traction. Ces deux résultats, exprimés en MPa, montrent la résistance et la rigidité du tissu. La déformation à la rupture définit le niveau de déformation de l'échantillon correspondant à la rupture de l'échantillon.

Analyses Statistiques

Toutes les analyses statistiques de significativité (one-way ANOVA test & Bonferonni) des résultats ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Les marqueurs de significativité équivalents aux valeurs suivantes : * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ et *** = $P < 0.001$. Les expériences impliquant la culture de cellules ont été faites au moins en duplicata avec un n de 3 ou 4. La production de biomatériaux avec les trois sources de collagène a été effectuée quatre fois (n=4).

CHAPITRE IV - RÉSULTATS

Chapitre IV – Résultats

Avant-Propos

Avant l'obtention de résultats, cette expérience a nécessité certaines mises au point quant à la production de ce biomatériau. Ces dernières ont eu pour but de modifier la technique actuelle de production à moyenne échelle. Cette technique est utilisée dans notre laboratoire depuis des années afin de produire différentes matrices 3D pour l'évaluation de la migration axonale ou pour la production de substituts dermiques en tout genre (Black, Berthod et al. 1998; Gingras, Bergeron et al. 2003; Gingras, Paradis et al. 2003; Tremblay, Berthod et al. 2005; Caissie, Gingras et al. 2006; Gingras, Beaulieu et al. 2008). Il a donc fallu mettre au point une méthode de solubilisation du collagène à petite échelle afin de pouvoir produire différents lots d'éponges de petites quantités de matière première (< 1 g) et ce, pour les trois sources de collagène.

Il est important, avant de commencer la présentation des résultats, d'effectuer quelques précisions quant aux collagènes utilisés. Bien que tous les collagènes aient été extraits selon la méthode acido-basique, il reste qu'il y a des variabilités entre les extractions faites chez Agriculture et Agroalimentaire Canada (collagènes porcine et aviaire) versus celle faite commercialement (collagène bovin). Il est plus que probable que les collagènes porcine et aviaire extraits expérimentalement contiennent des taux d'impuretés légèrement plus élevés que le collagène bovin commercial. Cependant, n'ayant pas de données précises quant aux quantités d'impuretés pouvant être présentes dans chaque source de collagène (pureté \approx 95 %), ce facteur ne sera pas pris en compte lors de la présentation et de l'analyse de ces résultats.

4.1 Aspect macroscopique des collagènes selon leur source

Le premier paramètre analysé lors de cette expérience est l'aspect macroscopique des collagènes utilisés. Selon leur source, ces derniers n'ont pas la même apparence visuelle et n'ont pas non plus le même temps de solubilisation. Le collagène porcine s'est avéré beaucoup plus difficile à solubiliser que les deux autres. Pour arriver au même résultat, ce dernier devait être agité en solution acide à 37°C pendant plus de trois heures soit au moins deux heures de plus que les collagènes bovin et aviaire. L'évaporation étant un facteur négligeable étant donné l'utilisation de dispositifs de culture avec agitation hermétiques.

Cependant, visuellement, les différences entre les collagènes bovin et porcine sont minimes contrairement à leur contrepartie aviaire. Comme le montre la figure 19, les sources bovine et porcine produisent des solutions translucides contrairement à celle aviaire qui donne une solution jaunâtre et presque opaque.

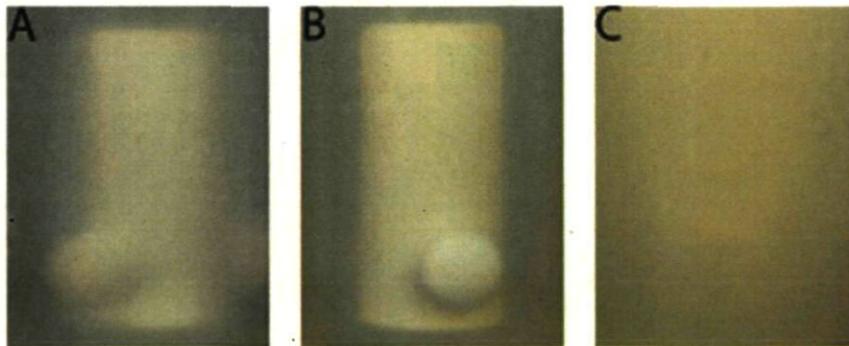


Figure 19: Aspect macroscopique des collagènes bovin (A), porcine (B) et aviaire (C) après solubilisation dans l'acide acétique 0,1% à une concentration d'environ 1,3 % (m/v).

4.2 Aspect microscopique et caractérisation des pores

Les analyses en microscopie électronique à balayage (MEB) ont en premier lieu permis de vérifier l'apparence microscopique des pores produits avec chaque source de collagène. Ensuite, ces mêmes images nous ont servi à la détermination de la taille et de la régularité des pores dans les biomatériaux produits.

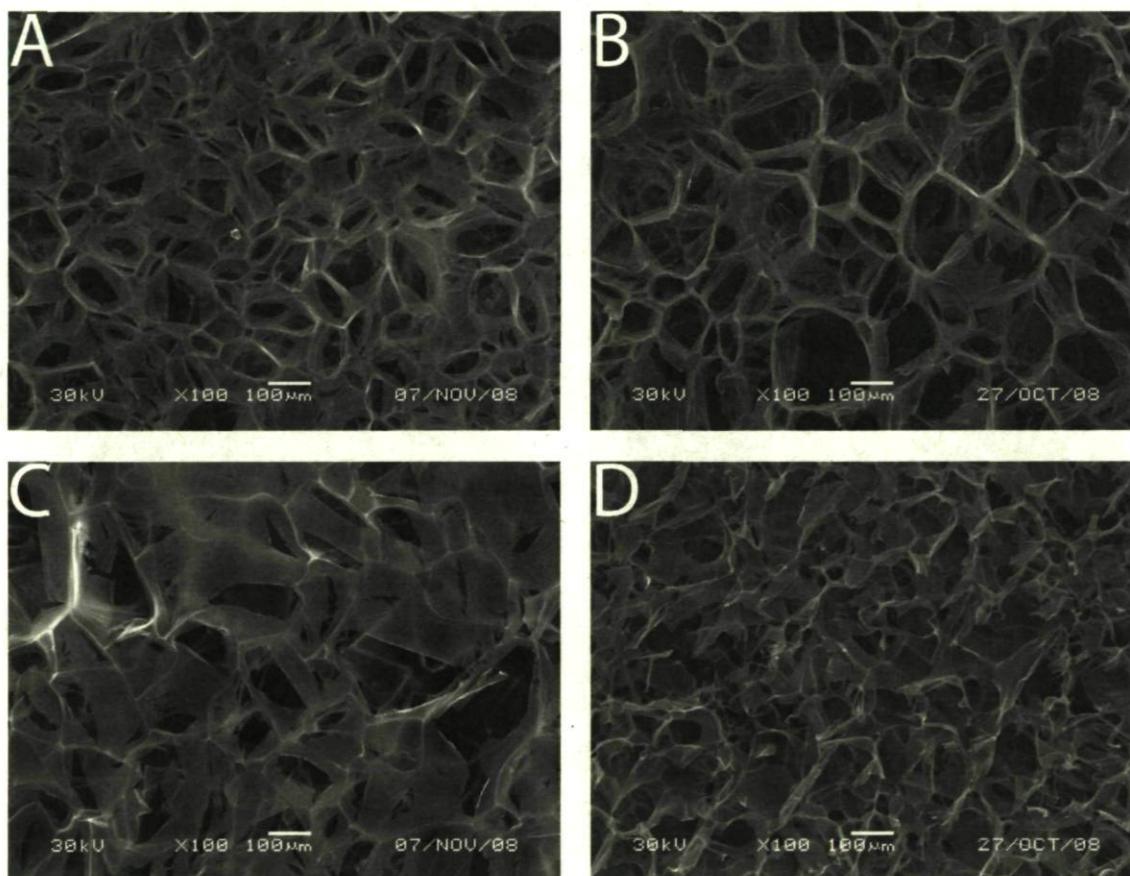


Figure 20: Apparence microscopique des pores des éponges selon la source de collagène utilisée soit bovin (A), porcine (B), aviaire (C) ou avec seulement du chitosane (D).

La figure 20 permet la visualisation de la taille et de la distribution des pores dans les éponges produites avec différentes sources de collagène. Il est facile de voir la différence de grosseur entre les pores des différents biomatériaux à base de collagène et de

chitosane (A-C). Une différence de régularité des pores est observable entre les éponges à base de collagène aviaire (C) et celles de sources bovine et porcine (A & B). Les éponges produites avec seulement du chitosane (D) ont quant à elles une structure totalement différente. Les pores sont moins définis, plus petits et très irréguliers. Cependant, ces éponges de chitosane ne sont pas utilisées au cours de cette expérience, car le chitosane se solubilise dans le milieu de culture après un certain temps.

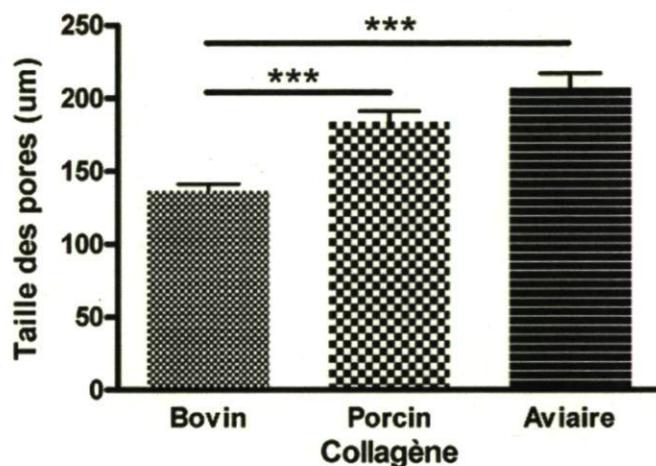


Figure 21: Statistique de la taille moyenne des pores des éponges de collagène-chitosane selon la source de collagène utilisée (n=4).

Les résultats de la figure 21 concernant la taille moyenne des pores des éponges en fonction des différentes sources de collagène utilisé permettent la confirmation statistique de ce qui est observable dans la figure 20. En effet, ces données montrent la différence significative de taille entre les collagènes porcine et aviaire expérimentaux et le collagène bovin étant en quelque sorte le standard de cette étude.

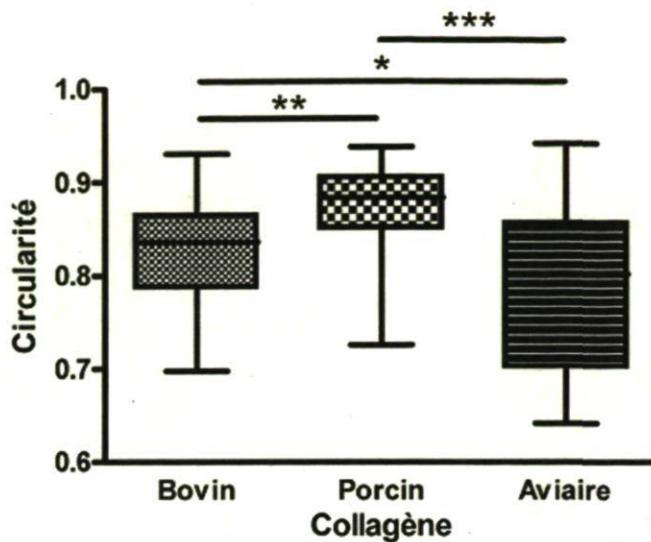


Figure 22: Représentation graphique de la circularité des pores des biomatériaux selon la source de collagène utilisée où 1 représente un cercle parfait et 0 une ligne (n=4).

Les données de la figure 22 permettent encore de valider les observations faites en analysant la figure 20. Le collagène porcine est celui qui produit les pores les plus circulaires suivis du collagène bovin et ensuite du collagène aviaire. Il est intéressant de constater que le collagène porcine se démarque des deux autres en ce qui a trait à la circularité des pores.

4.3 Les tests mécaniques

Les propriétés mécaniques d'un biomatériau sont très importantes dans la vérification de l'implantabilité d'un produit. Pour connaître les diverses propriétés mécaniques d'un biomatériau, ce dernier doit subir des tests de traction. Les données ainsi obtenues permettent de calculer le module d'élasticité, la déformation à la rupture et la résistance mécanique maximale du biomatériau testé. Pour la mise au point d'un substitut

dermique, il est primordial que le biopolymère produit ait des propriétés mécaniques qui permettent sa manipulation et sa suture.

Pour cette série de résultats, les temps de mesure ont été : avant ensemencement ainsi que 1, 2, 3, 7, 14, 21 et 35 jours après l'ensemencement des fibroblastes dermiques humains.

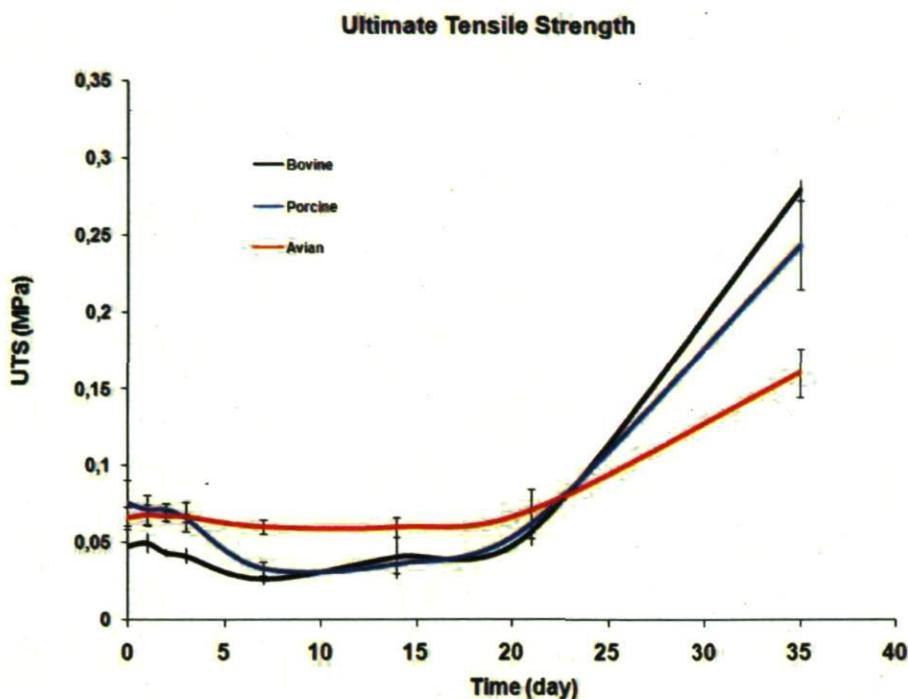


Figure 23: Résistance mécanique des équivalents dermiques en fonction du temps de culture selon la source de collagène utilisée.

Le graphique de la figure 23 permet de visualiser l'effet des fibroblastes sur la résistance mécanique de chaque biomatériau dans les jours suivant l'ensemencement des cellules. Bien que ce soit négligeable, on peut remarquer une légère perte de force des biomatériaux durant la première semaine de culture. Par la suite, il y a rétablissement de la résistance mécanique initiale entre la deuxième et la troisième semaine de culture. Finalement, il y a consolidation de la structure de chaque biomatériau et augmentation considérable de la résistance mécanique après la troisième semaine de culture.

Il est intéressant de constater que la variation initiale de résistance mécanique est à peine perceptible pour le collagène aviaire. De plus, ce dernier n'acquiert pas autant de résistance mécanique au fil du temps que les deux autres biomatériaux testés.

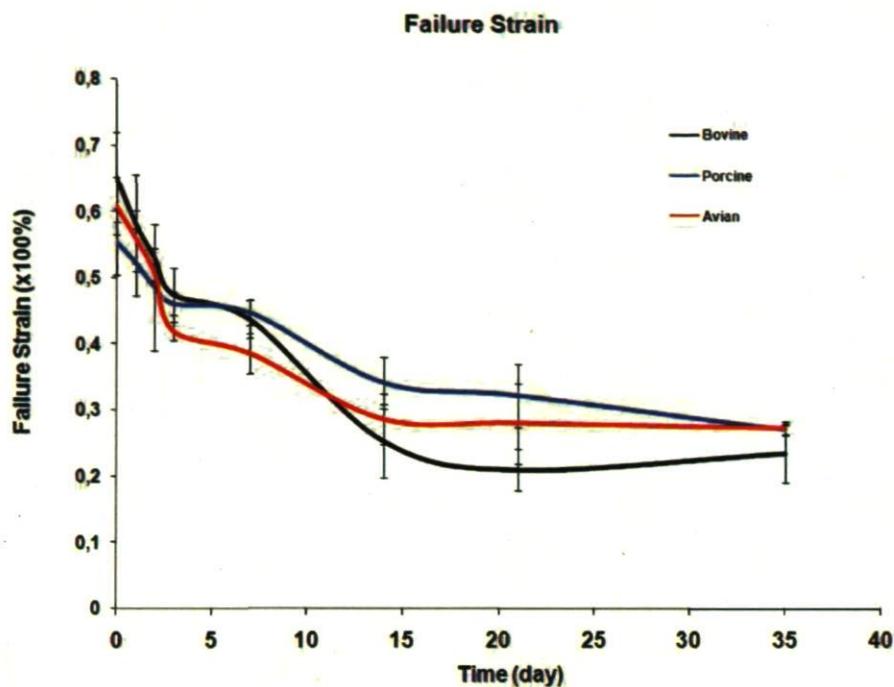


Figure 24: Déformation à la rupture des équivalents dermiques en fonction du temps de culture selon la source de collagène utilisée.

Les données de déformation à la rupture de la figure 24 permettent de suivre la capacité d'élongation des équivalents au cours du processus de colonisation cellulaire par les fibroblastes. Le graphique ci-dessus montre une baisse de la déformation à la rupture jusqu'au quatorzième jour de culture. Par la suite, le pourcentage de déformation à la rupture semble se stabiliser à environ 30 %.

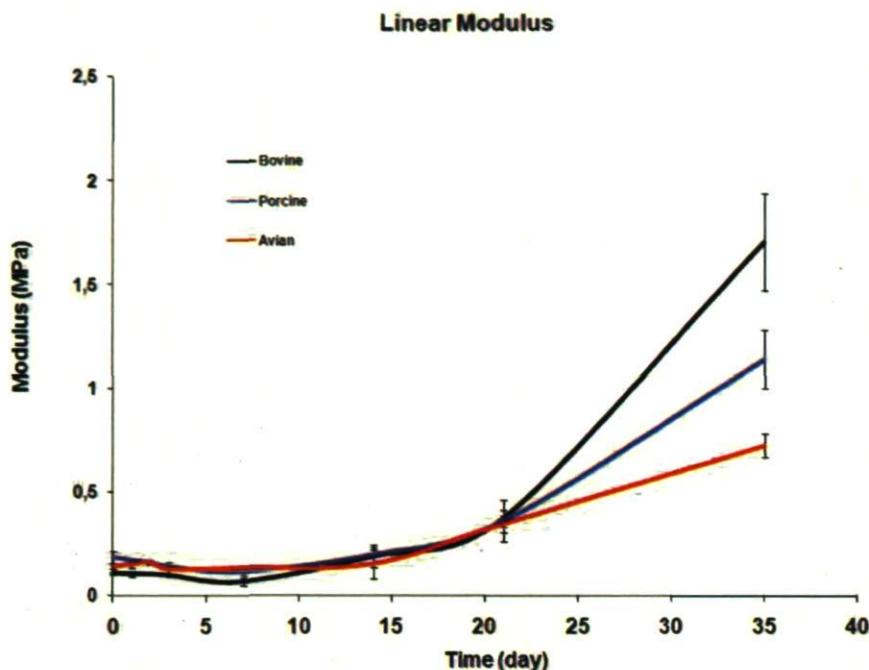


Figure 25: Module d'élasticité des équivalents dermiques en fonction du temps de culture selon la source de collagène utilisée.

Les résultats illustrés à la figure 25 permettent de voir qu'au fil du temps les équivalents dermiques, peu importe la source de collagène utilisée, tendent vers une rigidité toujours croissante. Cette donnée appelée module d'élasticité est en fait la relation entre la force maximale appliquée à l'équivalent et le déplacement atteint à ce moment de force. Étant donné que la force mécanique continue à augmenter après la deuxième semaine de culture et que la déformation à la rupture semble se stabiliser à ce moment de la colonisation par les fibroblastes, il est normal de voir cette valeur augmenter.

4.4 La colonisation cellulaire

La colonisation par les fibroblastes dermiques humains des éponges, produites avec les différentes sources de collagène, a pu être vérifiée par des analyses histologiques et immunohistochimique des biopsies. Ces résultats ont permis de suivre la progression des cellulesensemencées à l'intérieur de la matrice de collagène et de chitosane au fil du

temps. Ces données, présentant la progression et l'organisation cellulaire dans chacun des biomatériaux produits, sont essentielles à la compréhension des résultats de résistance mécanique.

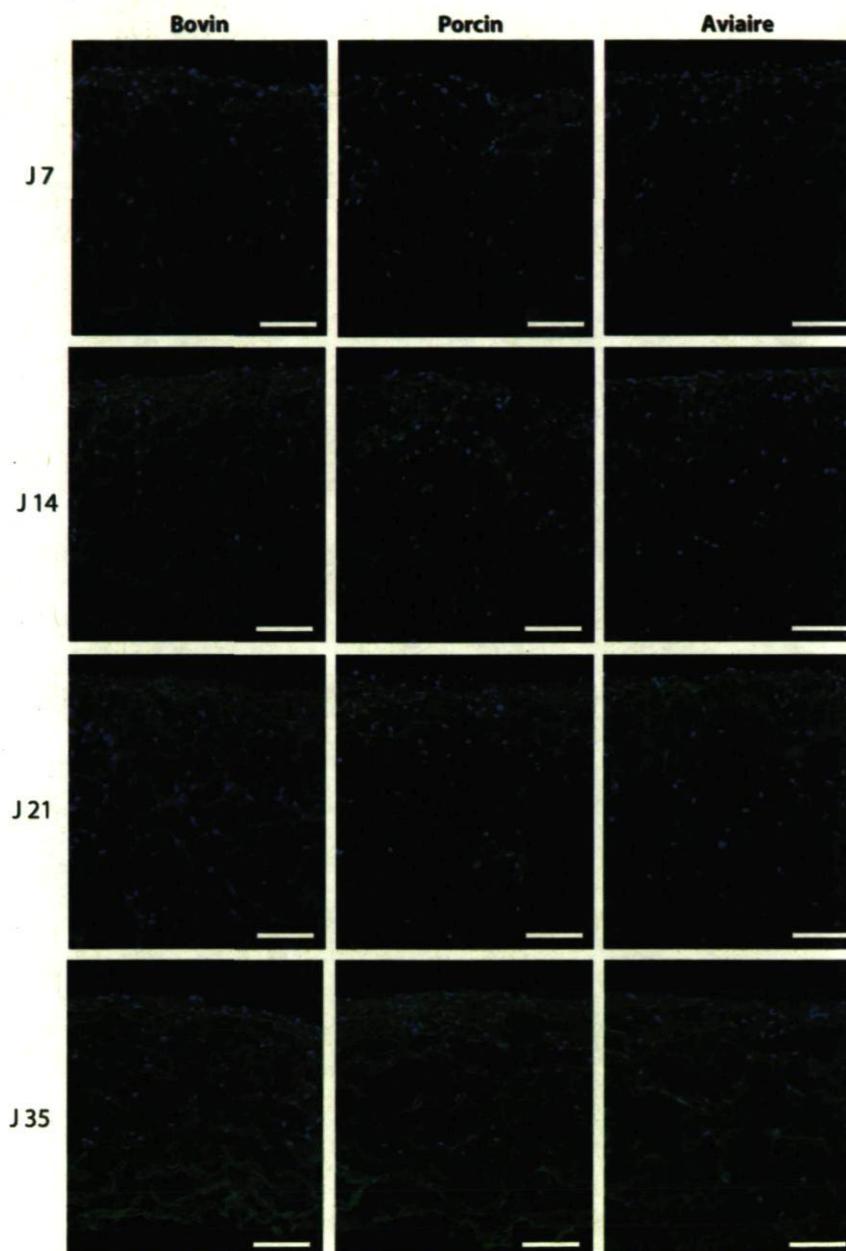


Figure 26: Visualisation immunohistochimique des cellules (noyaux, en bleu) et de la MEC produite (décorine, en vert) après 7, 14, 21 et 35 jours de culture avec des fibroblastes dermiques humains (barre = 100 μ m).

La figure 26 permet la visualisation de la MEC produite par les fibroblastes dermiques humains à plusieurs temps de culture. Le marqueur utilisé pour visualiser la MEC est la décorine. Ce dernier est un protéoglycane qui a pour but de contrôler la distance entre les fibres de collagène en se fixant à ces dernières. Cette molécule permet de suivre l'augmentation de la MEC sécrétée dans les biomatériaux à chaque intervalle de temps. La migration des cellules dans l'éponge est, quant à elle, observable en suivant les noyaux qui pénètrent dans la structure des éponges au fil du temps. La contraction des pores des éponges de collagène bovin, au jour 35, est beaucoup plus prononcée que dans les éponges des deux autres sources de collagène.

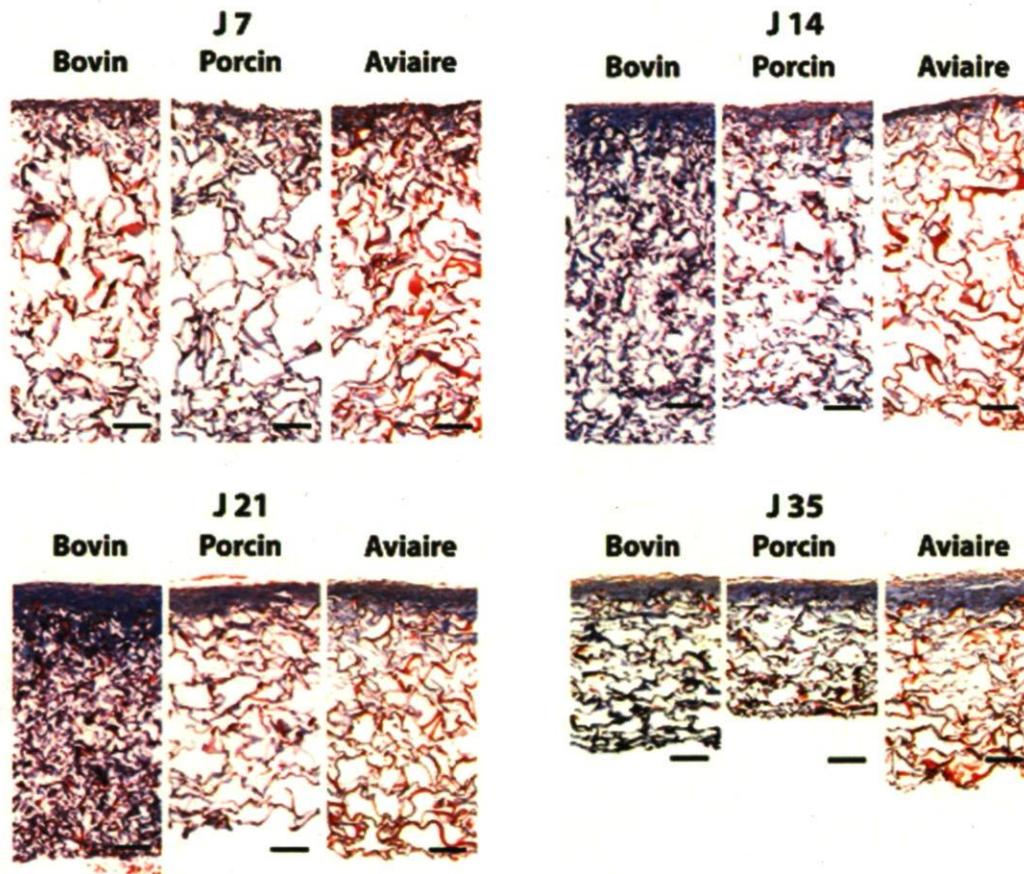


Figure 27: Visualisation histologique par coloration au trichrome de Masson (collagène en bleu et noyaux en rose foncé) après 7, 14, 21 et 35 jours de culture avec des fibroblastes dermiques humains (barre = 100µm).

Les résultats histologiques de la figure 27 appuient ce qu'illustrent déjà les analyses immunohistochimiques. Bien que les cellules soient plus difficilement observables dans cette figure, il est intéressant de pouvoir visualiser les enchevêtrements de MEC autour de la structure des biomatériaux à partir du jour 7 post-ensemencement. Le trichrome de Masson colorant le collagène en bleu et la matrice de l'éponge en rouge résulte souvent en une coloration mauve de la matrice de l'éponge. Cette série de résultats permet aussi de bien visualiser la contraction des biomatériaux au fur et à mesure que les fibroblastes les colonisent et remodelent la structure des éponges et leur propre MEC. Tel que mentionné précédemment, la réduction de la taille des pores des biomatériaux, au fil du temps, n'est pas aussi importante pour les collagènes porcins et aviaires que pour le collagène bovin.

4.5 L'activité des métalloprotéinases (MMP)

Les enzymes ayant pour but le remodelage de la MEC sont appelés métalloprotéinases ou MMP. Leur nom provient de ce que la structure tertiaire de ces protéines contient des ions métalliques nécessaires à leur bon fonctionnement. Les MMP sont essentielles à la croissance cellulaire tout au long de la vie des organismes pluricellulaires. Lors de cette expérience, la vérification de l'activité de ces dernières, en corrélation avec la survie cellulaire, est essentielle afin de vérifier si les résultats des tests mécaniques sont bel et bien dus aux effets des cellules sur les biomatériaux. Pour ce faire, une trousse Sensolyte™ a été utilisée afin de comparer l'activité totale des MMP présentes dans les différents échantillons de surnageants de culture à différents temps après l'ensemencement. Cette trousse étant basée sur l'utilisation d'un substrat des métalloprotéinases couplé à un fluorophore, soit le peptide 5-FAM/QXL™520.

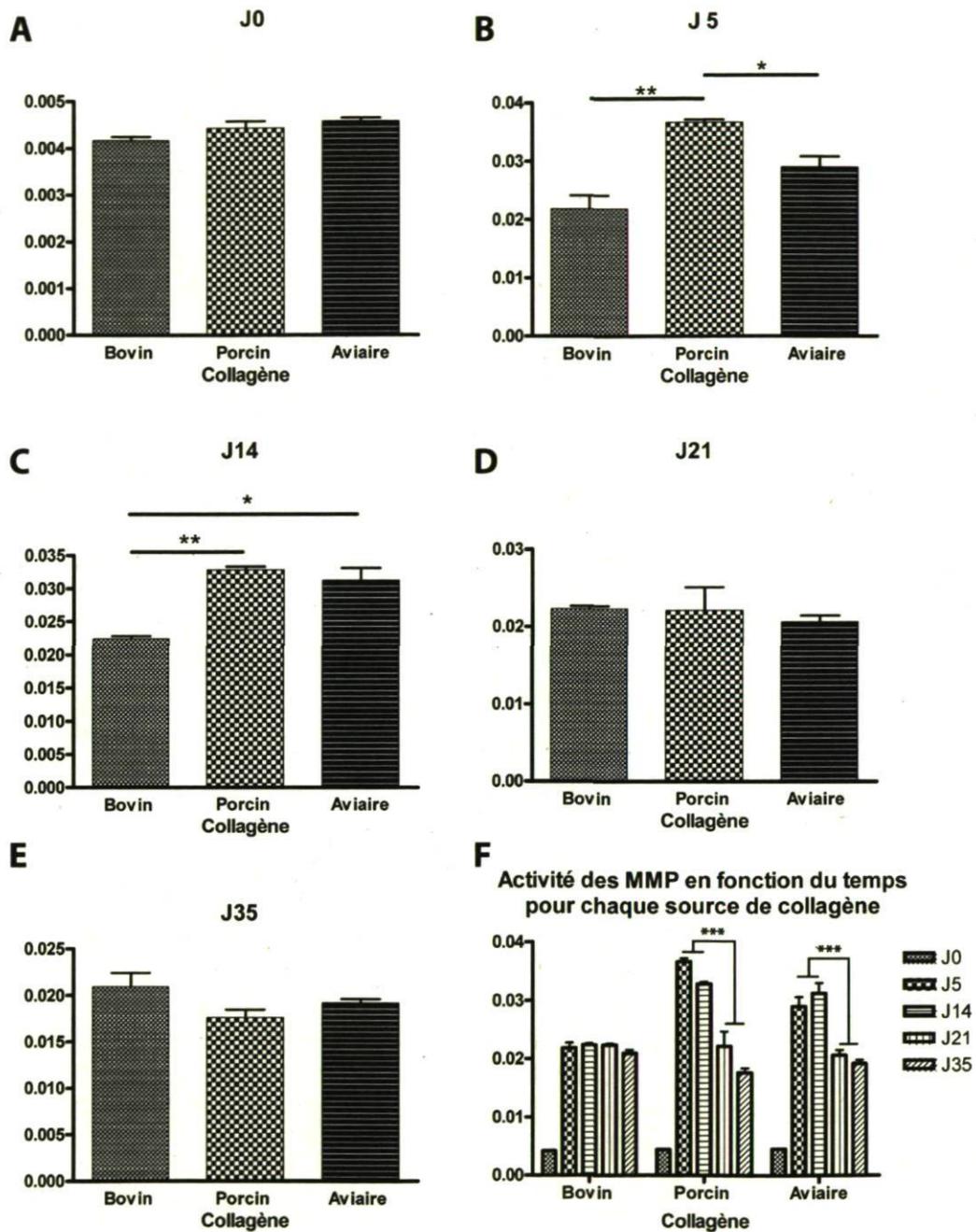


Figure 28: Comparaison de l'activité des MMP à différents temps de culture après l'ensemencement depuis le jour 0 jusqu'au jour 35 (A-E) et visualisation de l'activité globale des MMP tout au long de l'expérience(F) ($P < 0.001$ lorsque J0 est comparé aux autres jours d'analyse, non indiqués sur le graphique F) selon les sources de collagène.

La visualisation graphique des résultats de ce test à la figure 28 permet la mise en évidence des variations de l'activité enzymatique des MMP tout au long de la colonisation cellulaire des biomatériaux. Les données recueillies montrent la stabilité de l'activité des MMP tout au long de la colonisation de l'éponge par les fibroblastes en ce qui concerne l'utilisation du collagène bovin (graphique F).

Cependant, l'activité des MMP varie au fil du temps de culture en ce qui a trait aux collagènes porcine et aviaire. Ces deux sources de collagène semblent produire une importante activation des MMP dans les jours suivant l'ensemencement des fibroblastes dermiques humains contrairement à ce qui est observé avec les éponges de collagène bovin. Les différences d'activité enzymatique sont significatives entre les sources de collagène aux jours 5 et 14 ($P < 0,01$ et $P < 0,05$). Cependant, il est important de noter que le collagène porcine se démarque des deux autres sources par l'activation des MMP nettement supérieure à la moyenne, tout particulièrement au cinquième jour post-ensemencement (graphiques B et C). Par la suite, aux jours 21 et 35, il y a stabilisation de l'activité des métalloprotéinase dans les échantillons porcine et aviaire au niveau observé dans la condition bovine (graphiques D et E).

Il est important de mentionner que pour les conditions porcine et aviaire il y a une différence significative ($P < 0,001$) entre les valeurs d'activité enzymatique observées aux jours 5 et 14 en comparaison avec celles des jours 21 et 35 (graphique F).

4.6 La cytotoxicité des différents collagènes

La vérification de la mortalité cellulaire, durant cette expérience, a été effectuée grâce à la trousse Toxylight® qui dose la concentration d'adénylate kinase libérée dans le surnageant de culture. Cette enzyme, normalement contenue dans le cytoplasme des cellules, est libérée à l'extérieur des cellules lorsque l'intégrité de la membrane plasmique de ces dernières est menacée. Les données obtenues sont en fait des valeurs arbitraires de

luminescence. Plus il y a de cellules mortes, plus il y a d'adénylate kinase dans le milieu et plus le réactif de détection émet de photons qui sont détectés par le luminomètre.

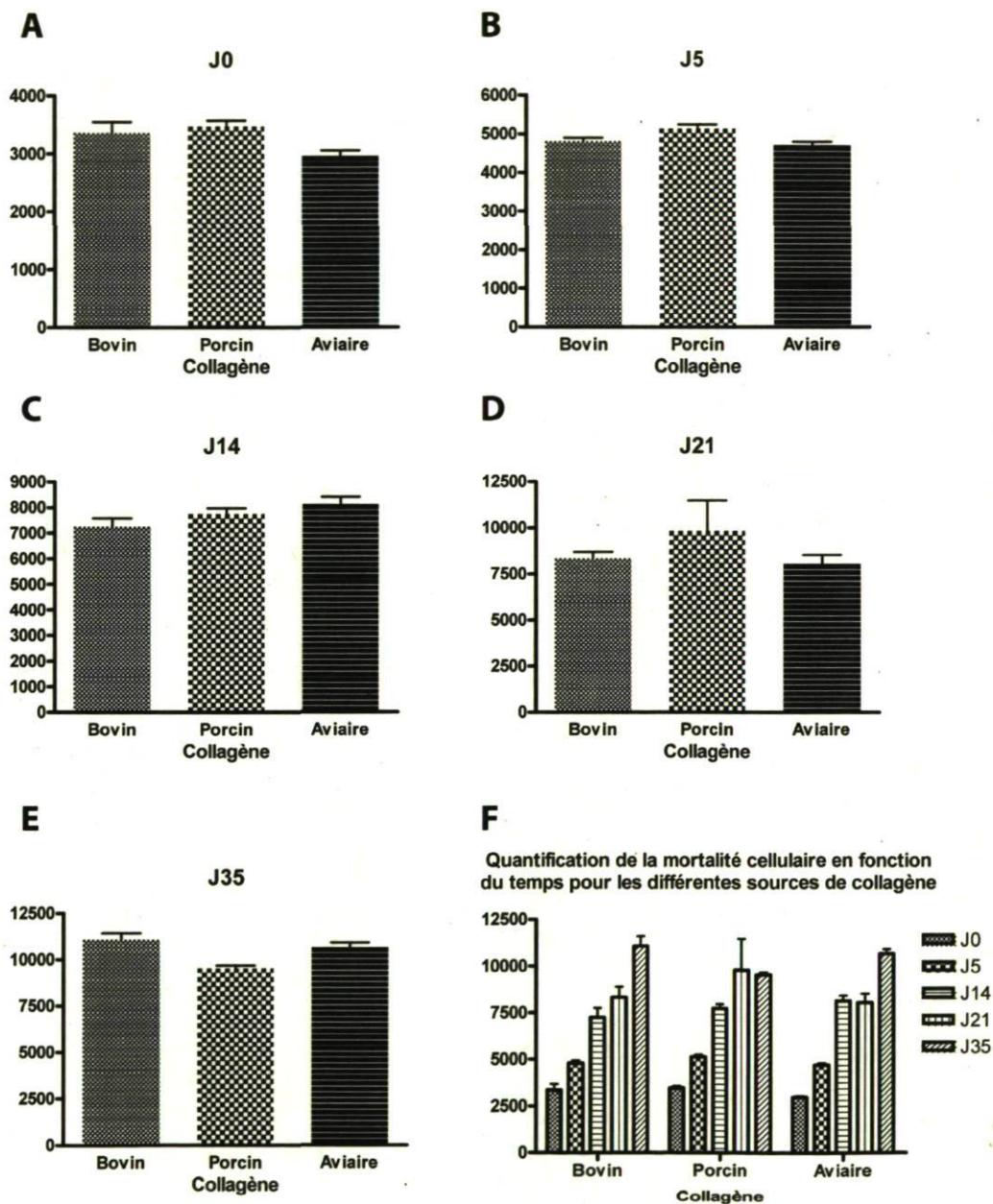


Figure 29: Comparaison de la mortalité relative à différents temps de culture après l'ensemencement depuis le jour 0 jusqu'au jour 35 (A-E) et visualisation globale de la mort cellulaire tout au long de l'expérience (F) selon les sources de collagène.

Les données de la figure 29 montrent que pour l'ensemble des collagènes testés, à chaque intervalle de temps, la quantité de cellules subissant une mort cellulaire quelles qu'elles soient est similaire (graphiques A-E). Il est possible de visualiser l'augmentation des événements de mort cellulaire au fil du temps, et ce, de la même manière pour les trois sources de collagène (graphique F).

CHAPITRE V - DISCUSSION

Chapitre V - Discussion

5.1 Aspect macroscopique des collagènes selon leur source

La première constatation faite lors de cette étude concerne la figure 19 où une différence d'opacité substantielle est observable entre les solutions de collagènes. Le collagène aviaire est la seule source de collagène testée qui résulte en une solution opaque. Les sources bovine et porcine produisent quant à elles des solutions translucides, lorsque solubilisées en milieu acide. Bien que plus difficilement observables (résultats non présentés), les biomatériaux préparés avec du collagène aviaire étaient d'une couleur jaunâtre comparativement à la couleur blanche des éponges produites avec les deux autres sources de collagène. Il est aussi intéressant de noter que lors de l'étape de solubilisation dans l'acide acétique, le collagène porcine nécessitait plusieurs heures d'agitation à 37°C de plus que les deux autres collagènes avant d'être complètement solubilisé.

5.2 Aspect microscopique et caractérisation des pores

La visualisation des éponges en microscopie électronique à balayage (MEB) à la figure 20 montre des différences flagrantes dans l'organisation des pores pour le collagène aviaire contrairement aux deux autres sources testées. La répartition et la structure des pores pour cette source de collagène se distinguent aussi de celles des collagènes bovin et porcine. Les pores résultant de l'utilisation d'une source aviaire sont beaucoup moins nombreux et plus grands. Les contours de ces pores sont aussi moins bien définis. Les différences entre les collagènes bovin et porcine sont, quant à elles, beaucoup moins marquées. Les pores des biomatériaux à base de collagène porcine sont plus grands que ceux des contrôles de source bovine, mais que légèrement plus petits que leur contrepartie aviaire. Le collagène porcine a aussi tendance à produire des pores très circulaires par rapport aux deux autres sources. Ces caractéristiques observables sur les images de MEB

de la figure 20 sont aussi statistiquement illustrées aux figures 21 et 22 sous forme graphique.

La production des différents biomatériaux testés se fait de façon simultanée. Donc la vitesse de refroidissement, qui est l'étape du processus de fabrication qui régit normalement la taille des pores, n'est pas en cause pour cette variation structurale.

La variabilité de la structure moléculaire des collagènes selon leur source est un élément envisageable. En ce qui concerne le collagène porcine, cette variation de la taille des pores pourrait, en partie, s'expliquer par la plus grande quantité de glycosaminoglycane (GAG) à la surface de ces fibres (Lin and Liu 2006). Cette présence accrue de GAG pourrait expliquer en partie l'augmentation de l'espace entre les fibres lors du processus de polymérisation avec le chitosane. Cependant, la taille des pores encore plus grande des biomatériaux produits avec le collagène aviaire et surtout l'irrégularité de ces derniers permettent d'envisager l'intervention d'autres facteurs dans la détermination de la taille de ces pores. La composition en acides aminés est un autre aspect pouvant interférer dans la polymérisation des biomatériaux et modifier la structure finale de ces derniers. Dans cet ordre d'idée, le contenu élevé en proline et en hydroxyproline du collagène aviaire pourrait être une explication plausible des résultats observés quant à la structure microscopique des éponges produites avec cette source de collagène (Lin and Liu 2006). Toutefois, il est plus difficile d'émettre des hypothèses sur les interactions moléculaires dans ce cas-ci. Il est aussi envisageable que les variabilités moléculaires des collagènes porcine et aviaire aient des interactions n'ont pas avec les molécules de chitosane, mais avec celles de l'eau. Considérant que c'est le processus de cristallisation de ce solvant qui forme les pores de l'éponge, il se pourrait que les différences de structures moléculaires des collagènes porcine et aviaire produisent une augmentation de la taille des cristaux d'eau créés à cette étape.

5.3 Les tests mécaniques

La visualisation, à la figure 23, de la perte de force des biomatériaux dans la première semaine de culture est attribuable à la sécrétion de MMP par les fibroblastes afin de pouvoir remodeler la matrice de l'éponge. Au fur et à mesure que les fibroblastes pénètrent dans l'éponge, ils sécrètent des MMP qui ont pour effet de dégrader le collagène de l'éponge afin de pouvoir pénétrer plus profondément dans sa structure. Cette action des MMP a donc comme effet initial l'affaiblissement du biomatériau, traduit par une perte de résistance mécanique. Par la suite, les fibroblastes continuent de sécréter des MMP, mais produisent aussi beaucoup de MEC ce qui se traduit par une reprise de la force initiale des biomatériaux et finalement par un accroissement de cette dernière. L'augmentation quasi exponentielle de la résistance mécanique après la troisième semaine de culture s'explique principalement par l'importante quantité de MEC sécrétée par les fibroblastes ayant colonisé la majeure partie des biomatériaux. La production de matrice qui s'accumule à l'intérieur des pores des éponges solidifie ces dernières. La grosseur croissante des pores des éponges des collagènes bovin < porcin < aviaire pourraient être, en partie, responsable des différences entre les valeurs de résistance mécanique récupérées au jour 35. La relation inversement proportionnelle entre ces deux paramètres s'expliquerait par la plus grande quantité de MEC devant être produite avant d'atteindre le même niveau de consolidation des biomatériaux.

La variation des valeurs de déformation à la rupture, observable à la figure 24, s'explique de façon similaire. Tout comme la résistance mécanique augmente au cours de la colonisation cellulaire, l'élongation à la rupture diminue, car la MEC se déposant sur la structure des éponges empêche ces dernières de s'étirer autant que les biomatériaux initiaux. Bien que les valeurs de résistance mécanique semblent continuer à augmenter, l'élongation à la rupture tend à se stabiliser. La stabilisation de ce paramètre tend vers une valeur représentative de déformation possible de la MEC produite. Dans ce cas-ci, il est intéressant de constater que ces données ont tendance à se stabiliser vers 30 %, valeur qui est près de la limite inférieure de déformation à la rupture de la peau normale humaine soit d'environ 40 % (Hult and Goltz 1965; Haut 1989). Ces données sont très importantes dans

une perspective d'application clinique, car ce sont ces dernières qui représentent la flexibilité du biomatériau, lorsque greffé.

Le module d'élasticité étant la relation entre les deux paramètres précédents, il tend à augmenter de façon similaire à la résistance mécanique étant donné la stabilisation des valeurs de déformation à la rupture.

5.4 La colonisation cellulaire

Un biomatériau servant de substitut dermique doit permettre la migration cellulaire avec le moins de contraintes possible. Les observations sur la colonisation cellulaire faites lors de cette étude permettent de valider la compatibilité des différents collagènes avec les fibroblastes dermiques humains. Cette constatation découle entre autres des résultats de la figure 26, où l'on peut observer la migration des cellulesensemencées dans le biomatériau jusque dans sa quasi-totalité. Après environ un mois, la colonisation de l'éponge est presque complète et la présence de MEC autour de la structure de l'éponge est facilement observable par immunohistochimie. De plus, à la figure 27, la présence de cette même MEC est visualisable à l'intérieur des pores des biomatériaux en histologie grâce à la coloration au TM qui colore le collagène en bleu.

Il est aussi intéressant de voir que les pores ont moins tendance à se refermer pour les éponges de collagènes porcine et aviaire. Cette observation est en accord avec certains tests préliminaires de contraction qui ne sont pas présentés dans la section résultats de ce manuscrit (voir figure 31, Annexe I). Ces différences de contraction pourraient être attribuables, soit à la différence de taille des pores ou à la structure moléculaire des collagènes utilisés. À la lumière des données recueillies, la taille des pores serait le facteur qui concorderait le plus avec les différences de contraction des biomatériaux.

5.5 L'activité des MMP

Les résultats obtenus dans cette section permettent d'expliquer en partie le comportement des biomatériaux lors des tests mécaniques. Comme mentionné précédemment, l'activité des MMP est essentielle à la colonisation cellulaire. Ces enzymes permettent aux fibroblastes de remodeler leur environnement. Ce remaniement de la structure des biomatériaux est essentiel au processus de colonisation cellulaire des éponges comme l'illustre, ci-dessous, la figure 30. L'activité enzymatique des MMP, au tout début de la colonisation cellulaire, se traduit par la perte de résistance mécanique qui est observée dans les premiers jours suivant l'ensemencement des fibroblastes dermiques humains. Par la suite la production de MEC entraîne une reprise de cette résistance mécanique pour ensuite augmenter cette dernière au fur et à mesure que les fibroblastes produisent de la MEC qui consolide la structure initiale de l'éponge.

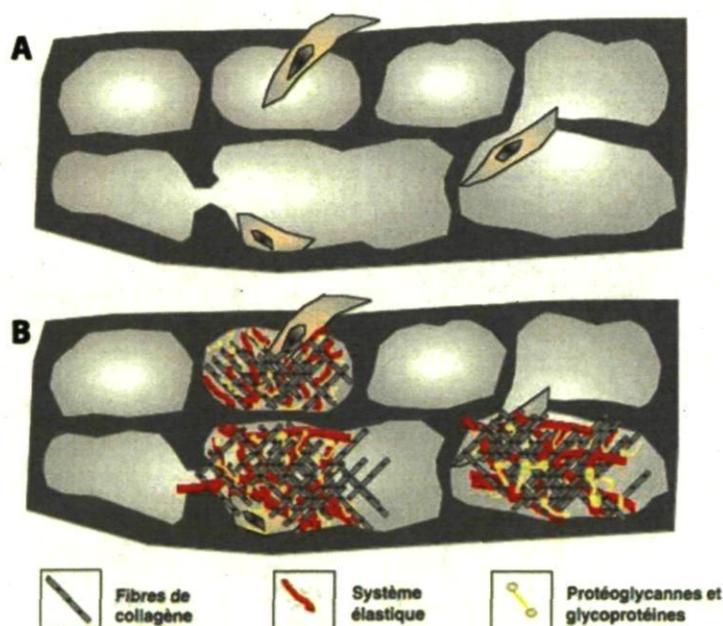


Figure 30: Schématisation du processus de colonisation de l'éponge de collagène et de chitosane par des fibroblastes. Pénétration de la structure et remodelage de la matrice de l'éponge, durant les dix premiers jours (A). Production de MEC et remodelage de cette dernière, durant les semaines suivantes (B).

La partie la plus intéressante des données illustrées dans les graphiques de la figure 28 est la différence significative d'activité enzymatique entre les collagènes expérimentaux et le collagène bovin. Encore une fois, les variabilités moléculaires mentionnées plus haut, par rapport aux différentes sources de collagènes, pourraient être à l'origine des phénomènes observés lors de cette étude. Il a été démontré que les molécules de GAG avaient des effets modulateurs sur l'activité de certaines MMP (Isnard, Robert et al. 2003). À la lumière de ces résultats, il apparaît évident que des structures moléculaires latérales des fibres de collagène dans le cas des collagènes porcins et aviaires engendrent une réaction accrue des MMP. Cette réaction se traduit par une augmentation de l'activité enzymatique dans les jours suivant l'ensemencement des cellules. Les résultats obtenus semblent suggérer que la quantité de GAG présents à la surface des fibres de collagène utilisées augmente la production de MMP par les fibroblastes dermiques humains. Ces données sont en accord avec différentes études démontrant une présence accrue de GAG dans les collagènes porcins (Lin and Liu 2006) ainsi que l'effet de ces molécules sur l'activité de certaines MMP (Isnard, Robert et al. 2003). Le dosage de la quantité réelle de GAG contenus dans les biomatériaux produits avec les différentes sources de collagène pourrait appuyer ces résultats.

5.6 La cytotoxicité des différents collagènes

Les données obtenues dans cette section servent à confirmer que les différences soulignées entre les différentes sources de collagène testées sont bel et bien attribuables à la structure des collagènes même et à celle des biomatériaux produits, et non à un quelconque effet sur la viabilité cellulaire. Dans tous les cas observés, la mortalité cellulaire augmente en suivant la prolifération des fibroblastes dermiques humains. À la figure 29, aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents collagènes utilisés, et ce, à tous les intervalles de temps vérifiés.

Conclusion

Les résultats obtenus lors de cette étude soulèvent plusieurs questions quant à l'importance des structures moléculaires des produits utilisés pour la production de biomatériaux. Bien que cette étude ait eu pour but de trouver des alternatives au collagène bovin, dans le cadre de la problématique des prions, il s'avère que les conclusions tirées de cette dernière dépassent les exigences fixées à prime abord.

En premier lieu, il est important de souligner que les collagènes porcine et aviaire pourraient très bien être envisagés comme alternatives au collagène bovin. Cependant, il faut être conscient du travail de mise au point qui est nécessaire pour produire des éponges ayant une structure 3D similaire à celle obtenue avec le collagène bovin. Les principaux aspects de cette mise au point sont l'optimisation du ratio collagène : chitosane et la vitesse de congélation au cours du processus de lyophilisation, et ce, afin de s'assurer de la constance dans la taille des pores; ce paramètre ayant été souligné comme étant primordial lors de cette étude. Il était aussi important de vérifier si la modification de certains de ces paramètres, comme le ratio des biopolymères, peut influencer la valeur à laquelle se stabilise la déformation à la rupture des équivalents dermiques. Cette propriété mécanique étant cruciale dans un processus de mise au point d'un équivalent dermique pour d'éventuelles applications cliniques.

Par la suite, considérant que l'utilisation des collagènes porcine et aviaire est envisageable au même titre que le collagène bovin, il devient très intéressant de poursuivre cette étude pour déterminer qu'elles sont les variations moléculaires à l'origine des différences observées. Tout d'abord, il est important de quantifier le contenu en GAG de chaque biomatériau produit, et ce, après avoir standardisé la taille des pores. Cette étape de standardisation étant essentielle pour pouvoir observer seulement les effets des variabilités moléculaires des collagènes et non pas ceux des différences de structure 3D. Dans un même ordre d'idée, l'activation des MMP par les différentes sources de collagène pourra être validée en parallèle avec la production de substitut contenant des quantités précises de

GAG. De cette façon, le réel effet sur l'activation des MMP par les GAG contenu dans les biomatériaux pourra être observé. En parallèle, l'effet de ces molécules sur la colonisation cellulaire des éponges de collagène et de chitosane pourra aussi être vérifié.

De plus, pour faire suite aux résultats préliminaires présentés en annexe, des études de contraction devront être effectuées avec des éponges ayant des tailles de pores et des sources de collagène différentes. Bien que les résultats de tests préliminaires indiquent une contraction décroissante des collagènes bovin » porcine » aviaire tant au niveau macroscopique que microscopique (immunohistochimie et histologie), il importe de vérifier la validité statistique de ces résultats avant de pouvoir avancer une conclusion certaine.

Finalement, suite à l'optimisation de la production de biomatériaux avec les collagènes porcine et aviaire, il serait possible de mettre en branle des études *in vitro* et *in vivo*. Ces expériences auraient pour but le suivi de la colonisation et de la dégradation des biomatériaux au fil du temps selon la composition de ces derniers. Des tests d'épithélialisation seraient ensuite l'étape importante pour ce projet de recherche dans l'optique d'applications cliniques futures tel que la greffe de peau de pleine épaisseur.

Annexe I

Résultats préliminaires des tests de contraction d'éponges ensemencées avec des fibroblastes dermiques humains et des cellules endothéliales humaines comparativement à des éponges ensemencées avec des fibroblastes dermiques humains seulement et cultivées pendant 14 jours en conditions immergée.

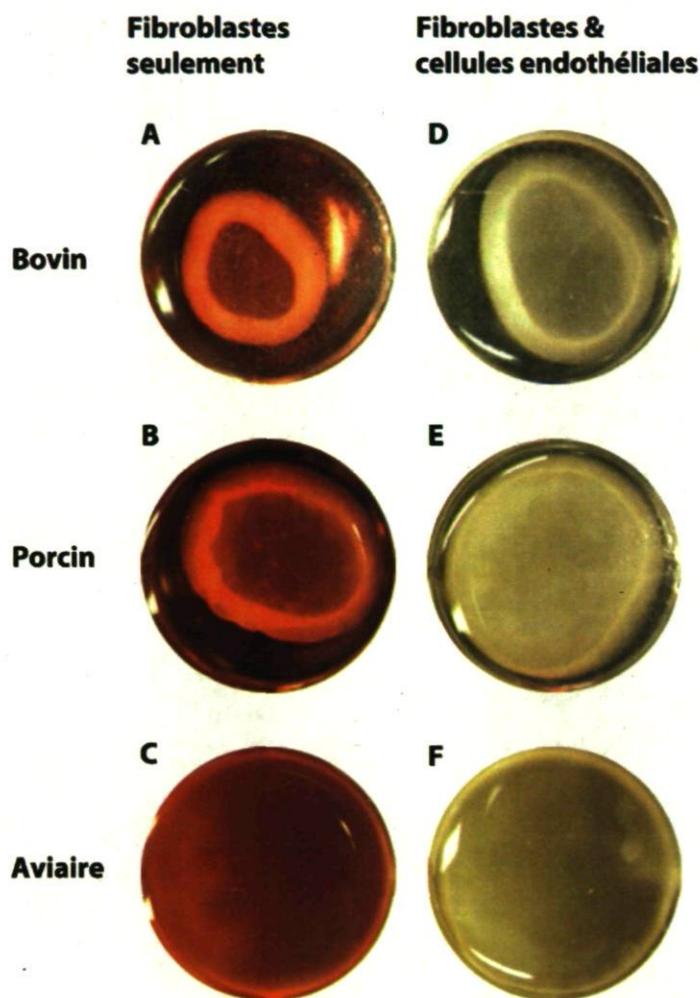


Figure 31: Résultats préliminaires des tests de contraction d'éponges ensemencées avec des fibroblastes dermiques humains (A-C) et avec aussi des cellules endothéliales (D-F) selon les sources de collagène utilisées, après 14 de culture en condition immergée.

Bibliographie

- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2002). Molecular Biology of The Cell. New York, Garland Science.
- Alsarra, I. A. (2009). "Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds." Int J Biol Macromol **45**(1): 16-21.
- Alsarra, I. A., A. Y. Hamed, et al. (2009). "Mucoadhesive polymeric hydrogels for nasal delivery of acyclovir." Drug Dev Ind Pharm **35**(3): 352-62.
- Arem, A. (1985). "Collagen modifications." Clin Plast Surg **12**(2): 209-20.
- Auger, F. A., D. Lacroix, et al. (2009). "Skin substitutes and wound healing." Skin Pharmacol Physiol **22**(2): 94-102.
- Azad, A. K., N. Sermsintham, et al. (2004). "Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **69**(2): 216-22.
- Baumann, L. S. and F. Kerdel (1999). "The treatment of bovine collagen allergy with cyclosporin." Dermatol Surg **25**(3): 247-9.
- Baxter, C. R. and J. F. Waeckerle (1988). "Emergency treatment of burn injury." Ann Emerg Med **17**(12): 1305-15.
- Beanes, S. R., C. Dang, et al. (2003). "Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta." Expert Rev Mol Med **5**(8): 1-22.
- Beil, W., R. Timpl, et al. (1973). "Conformation dependence of antigenic determinants on the collagen molecule." Immunology **24**(1): 13-24.
- Berthod, F., G. Saintigny, et al. (1994). "Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage." Clin Mater **15**(4): 259-65.
- Black, A. F., F. Berthod, et al. (1998). "In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent." Faseb J **12**(13): 1331-40.
- Boucard, N., C. Viton, et al. (2007). "The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns." Biomaterials **28**(24): 3478-88.
- Bough, W. A., W. L. Salter, et al. (1978). "Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products." Biotechnology and Bioengineering **20**(12): 1931-1943.
- Boyce, S. T., D. J. Christianson, et al. (1988). "Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes." J Biomed Mater Res **22**(10): 939-57.
- Boyce, S. T., M. J. Goretsky, et al. (1995). "Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns." Ann Surg **222**(6): 743-52.
- Brunicaudi FC, A. D., Billiar TR, Dunn DL, Hunter and P. R. JG (2005). Schwartz's principles of surgery. McGraw-Hill. New York: 204-28.
- Burd, A. (2007). "Evaluating the use of hydrogel sheet dressings in comprehensive burn wound care." Ostomy Wound Manage **53**(3): 52-62.
- Cai, D. Z., C. Zeng, et al. (2007). "Biodegradable chitosan scaffolds containing microspheres as carriers for controlled transforming growth factor-beta1 delivery for cartilage tissue engineering." Chin Med J (Engl) **120**(3): 197-203.
- Caissie, R., M. Gingras, et al. (2006). "In vivo enhancement of sensory perception recovery in a tissue-engineered skin enriched with laminin." Biomaterials **27**(15): 2988-93.

- Campbell, N. A., J. B. Reece, et al. (1995). *Biologie*, ERPI: 69.
- Chang, J. J. and J. H. Hash (1979). "The use of an amino acid analyzer for the rapid identification and quantitative determination of chitosan oligosaccharides." *Anal Biochem* **95**(2): 563-7.
- Charriere, G., M. Bejot, et al. (1989). "Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients." *J Am Acad Dermatol* **21**(6): 1203-8.
- Chatterjee, S., M. Adhya, et al. (2005). "Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization." *Process Biochemistry* **40**(1): 395-400.
- Chvapil, M. (1982). "Considerations on manufacturing principles of a synthetic burn dressing: a review." *J Biomed Mater Res* **16**(3): 245-63.
- Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." *Annu Rev Neurosci* **24**: 519-50.
- Connor-Ballard, P. A. (2009). "Understanding and managing burn pain: part 1." *Am J Nurs* **109**(4): 48-56; quiz 57.
- Crumpton, M. (1974). *The molecular basis of antigenicity and immunogenicity. Protein Antigens*. S. M. New York, Academic Press: 1-78.
- Da Silva, C. A., D. Hartl, et al. (2008). "TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation." *J Immunol* **181**(6): 4279-86.
- Damour, O., P. Y. Gueugniaud, et al. (1994). "A dermal substrate made of collagen--GAG--chitosan for deep burn coverage: first clinical uses." *Clin Mater* **15**(4): 273-6.
- Davison, P. F., L. Levine, et al. (1967). "The serologic specificity of tropocollagen telopeptides." *J Exp Med* **126**(2): 331-46.
- Doillon, C. J., M. F. Cote, et al. (1994). "Porosity and biological properties of polyethylene glycol-conjugated collagen materials." *J Biomater Sci Polym Ed* **6**(8): 715-28.
- Domard, A., G. A. F. Roberts, et al. (1997). *Advances in Chitin Science*. Lyon, Jacques Andre Publisher.
- Donaghue, V. M., J. S. Chrzan, et al. (1998). "Evaluation of a collagen-alginate wound dressing in the management of diabetic foot ulcers." *Adv Wound Care* **11**(3): 114-9.
- Dornish, M., D. Kaplan, et al. (2001). "Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides. American Society for Testing and Materials." *Ann N Y Acad Sci* **944**: 388-97.
- Drake, M. P., P. F. Davison, et al. (1966). "Action of proteolytic enzymes on tropocollagen and insoluble collagen." *Biochemistry* **5**(1): 301-12.
- Eaglstein, W. H., O. M. Alvarez, et al. (1999). "Acute excisional wounds treated with a tissue-engineered skin (Apligraf)." *Dermatol Surg* **25**(3): 195-201.
- Eastoe, J. E. (1955). "The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin." *Biochem J* **61**(4): 589-600.
- Francis, M. J. and D. C. MacMillan (1971). "Extraction of polymeric collagen from human skin." *Biochem J* **122**(1): 34P.
- Freier, T., R. Montenegro, et al. (2005). "Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system." *Biomaterials* **26**(22): 4624-32.
- Furthmayr, H., W. Beil, et al. (1971). "Different antigenic determinants in the polypeptide chains of human collagen." *FEBS Lett* **12**(6): 341-344.
- Furthmayr, H. and R. Timpl (1976). "Immunochemistry of collagens and procollagens." *Int Rev Connect Tissue Res* **7**: 61-99.
- Geras, A. J. (1990). *Dermatology: a medical artist's interpretation*. Basel, Switzerland, Sandoz Medical Publications.

- Gingras, M., M. M. Beaulieu, et al. (2008). "In vitro study of axonal migration and myelination of motor neurons in a three-dimensional tissue-engineered model." *Glia* **56**(3): 354-64.
- Gingras, M., J. Bergeron, et al. (2003). "In vitro development of a tissue-engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth." *Faseb J* **17**(14): 2124-6.
- Gingras, M., I. Paradis, et al. (2003). "Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice." *Biomaterials* **24**(9): 1653-61.
- Goldfarb, L. G. and P. Brown (1995). "The transmissible spongiform encephalopathies." *Annu Rev Med* **46**: 57-65.
- Grant, N. H. and H. E. Alburn (1960). "Collagen solubilization by mammalian proteinases." *Arch Biochem Biophys* **89**: 262-70.
- Griffon, D. J., M. R. Sedighi, et al. (2006). "Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering." *Acta Biomater* **2**(3): 313-20.
- Gross, J., J. H. Highberger, et al. (1955). "Extraction of Collagen from Connective Tissue by Neutral Salt Solutions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **41**(1): 1-7.
- Hackman, R. H. and M. Goldberg (1965). "Studies on chitin. VI. The nature of alpha- and beta-chitins." *Aust J Biol Sci* **18**(4): 935-46.
- Halata, Z., M. Grim, et al. (2003). "Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **271**(1): 225-39.
- Harriger, M. D., A. P. Supp, et al. (1997). "Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice." *J Biomed Mater Res* **35**(2): 137-45.
- Haut, R. C. (1989). "The effects of orientation and location on the strength of dorsal rat skin in high and low speed tensile failure experiments." *J Biomech Eng* **111**(2): 136-40.
- Hayes, M., B. Carney, et al. (2008). "Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan--Part B: applications." *Biotechnol J* **3**(7): 878-89.
- Hettiaratchy, S. and P. Dziewulski (2004). "ABC of burns: pathophysiology and types of burns." *Bmj* **328**(7453): 1427-9.
- Hillyard, I. W., J. Doczi, et al. (1964). "Antacid and Antiulcer Properties of the Polysaccharide Chitosan in the Rat." *Proc Soc Exp Biol Med* **115**: 1108-12.
- Hirano, S., Y. Ohe, et al. (1976). "Selective N-acylation of chitosan." *Carbohydr Res* **47**(2): 315-20.
- Hirano, S., K. Tobetto, et al. (1980). "Permeability properties of gels and membranes derived from chitosan." *J Biomed Mater Res* **14**(4): 477-85.
- Hirano, S., K. Tobetto, et al. (1981). "SEM ultrastructure studies of N-acyl- and N-benzylidene-chitosan and chitosan membranes." *J Biomed Mater Res* **15**(6): 903-11.
- Hirano, S., H. Tsuchida, et al. (1989). "N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis." *Biomaterials* **10**(8): 574-6.
- Hodde, J. and M. Hiles (2002). "Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method." *Biotechnol Bioeng* **79**(2): 211-6.
- Hosseini, S. N., S. N. Mousavinasab, et al. (2009). "A biological dressing versus 'conventional' treatment in patients with massive burns: a clinical trial." *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* **15**(2): 135-40.
- Hult, A. M. and R. W. Goltz (1965). "The Measurement of Elastin in Human Skin and Its Quantity in Relation to Age." *J Invest Dermatol* **44**: 408-12.
- Iida, J., T. Une, et al. (1987). "Stimulation of non-specific host resistance against Sendai virus and Escherichia coli infections by chitin derivatives in mice." *Vaccine* **5**(4): 270-274.

- Isnard, N., L. Robert, et al. (2003). "Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures." *Cell Biol Int* **27**(9): 779-84.
- Ito, M. (1991). "In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone-filling paste." *Biomaterials* **12**(1): 41-5.
- Jin, R., L. S. Moreira Teixeira, et al. (2009). "Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering." *Biomaterials* **30**(13): 2544-51.
- Kiyozumi, T., Y. Kanatani, et al. (2007). "The effect of chitosan hydrogel containing DMEM/F12 medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn." *Burns* **33**(5): 642-8.
- Klokkevold, P. R., L. Vandemark, et al. (1996). "Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro." *J Periodontol* **67**(11): 1170-5.
- Lee, C. G., C. A. Da Silva, et al. (2008). "Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles." *Curr Opin Immunol* **20**(6): 684-9.
- Lew, D. H., P. H. Liu, et al. (2007). "Optimization of UV cross-linking density for durable and nontoxic collagen GAG dermal substitute." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **82**(1): 51-6.
- Lin, Y. K. and D. C. Liu (2006). "Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species." *Food Chemistry* **99**(2): 244-251.
- Lindsley, H., M. Mannik, et al. (1971). "The distribution of antigenic determinants in rat skin collagen." *J Exp Med* **133**(6): 1309-24.
- Lineen, E. and N. Namias (2008). "Biologic dressing in burns." *J Craniofac Surg* **19**(4): 923-8.
- Mackay DR, M. R. (2006, 26 June 2009). "Skin graft." from <http://medlineplus.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002982.htm>.
- Maricich, S. M., S. A. Wellnitz, et al. (2009). "Merkel cells are essential for light-touch responses." *Science* **324**(5934): 1580-2.
- Mi, F. L., S. S. Shyu, et al. (2001). "Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing." *Biomaterials* **22**(2): 165-73.
- Michaeli, D., G. R. Martin, et al. (1969). "Localization of antigenic determinants in the polypeptide chains of collagen." *Science* **166**(3912): 1522-4.
- Miller, E. J. (1972). "Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin." *Biochemistry* **11**(26): 4903-9.
- Miller, E. J. and R. K. Rhodes (1982). "Preparation and characterization of the different types of collagen." *Methods Enzymol* **82 Pt A**: 33-64.
- Murphy, G. F., D. P. Orgill, et al. (1990). "Partial dermal regeneration is induced by biodegradable collagen-glycosaminoglycan grafts." *Lab Invest* **62**(3): 305-13.
- Muzzarelli, R. A., A. Ferrero, et al. (1972). "Light-scattering, X-ray diffraction, elemental analysis and infrared spectro- photometry characterization of chitosan, a chelating polymer." *Talanta* **19**(10): 1222-6.
- Muzzarelli, R. A. (1997). "Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives." *Cell Mol Life Sci* **53**(2): 131-40.
- Muzzarelli, R. A. and L. Sipos (1971). "Chitosan for the collection from seawater of naturally occurring zinc, cadmium, lead and copper." *Talanta* **18**(9): 853-8.
- Muzzarelli, R. A., F. Tanfani, et al. (1980). "The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared spectroscopy." *J Biochem Biophys Methods* **2**(5): 299-306.
- Muzzarelli, R. A. and O. Tubertini (1969). "Chitin and chitosan as chromatographic supports and adsorbents for collection of metal ions from organic and aqueous solutions and seawater." *Talanta* **16**(12): 1571-7.

- Muzzarelli, R. A. A. (1977). Chitin. Oxford, Pergamon Press.
- Muzzarelli, R. A. A. (1993). "Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients." Carbohydrate Polymers **20**(1): 7-16.
- Nagasawa, K., H. Watanabe, et al. (1970). "Ion-exchange chromatography of nucleic acid constituents on chitosan-impregnated cellulose thin layers." J Chromatogr **47**(3): 408-13.
- Nishimura, K., S. Nishimura, et al. (1984). "Immunological activity of chitin and its derivatives." Vaccine **2**(1): 93-9.
- Nishimura, S., N. Nishi, et al. (1986). "Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macrophages by O-(carboxymethyl)chitins." Carbohydr Res **146**(2): 251-8.
- Postlethwaite, A. E., J. M. Seyer, et al. (1978). "Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(2): 871-5.
- Pound, J. C., D. W. Green, et al. (2006). "Strategies to promote chondrogenesis and osteogenesis from human bone marrow cells and articular chondrocytes encapsulated in polysaccharide templates." Tissue Eng **12**(10): 2789-99.
- Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko (1995). "Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy." Annu Rev Biochem **64**: 403-34.
- Q. Li, E. T. D., E. W. Grandmison, et al. (1992). "Applications and Properties of Chitosan." Journal of Bioactive and Compatible Polymers **7**: 370 - 397.
- Ragetly, G. R., G. J. Slavik, et al. (2009). "Cartilage tissue engineering on fibrous chitosan scaffolds produced by a replica molding technique." J Biomed Mater Res A.
- Rajan, N., J. Habermehl, et al. (2006). "Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications." Nat Protoc **1**(6): 2753-8.
- Ralston, G. B., M. V. Tracey, et al. (1964). "The Inhibition of Fermentation in Baker's Yeast by Chitosan." Biochim Biophys Acta **93**: 652-5.
- Roberts, G. A. F. (1992). Chitin Chemistry. London, Macmillan Press, Ltd.
- Rubin, A. L., D. Pfahl, et al. (1963). "Tropocollagen: significance of protease-induced alterations." Science **139**: 37-9.
- Saintigny, G., M. Bonnard, et al. (1993). "Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts." Acta Derm Venereol **73**(3): 175-80.
- Schmitt, F. O., L. Levine, et al. (1964). "The Antigenicity of Tropocollagen." Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 493-7.
- Sezer, A. D., E. Cevher, et al. (2008). "Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits." Biol Pharm Bull **31**(12): 2326-33.
- Shahabeddin, L., F. Berthod, et al. (1990). "Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix." Skin Pharmacol **3**(2): 107-14.
- Shahidi, F. and J. Synowiecki (1991). "Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards." Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**(8): 1527-1532.
- Shigemasa, Y. and S. Minami (1995). Applications of Chitin and Chitosan for Biomaterials. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. Andover, Intercept Ltd. **13**: 383-420.
- Singer, A. J. and R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med **341**(10): 738-46.
- Soderhall, C., I. Marenholz, et al. (2007). "Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis." PLoS Biol **5**(9): e242.

- Speer, D. P., M. Chvapil, et al. (1980). "Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials." J Biomed Mater Res **14**(6): 753-64.
- Steffen, C., R. Timpl, et al. (1968). "Immunogenicity and specificity of collagen. V. Demonstration of three different antigenic determinants on calf collagen." Immunology **15**(1): 135-44.
- Stenzel, K. H., T. Miyata, et al. (1974). "Collagen as a biomaterial." Annu Rev Biophys Bioeng **3**(0): 231-53.
- Steven F. S., T. G. R., Tyson I. R. (1961). The Presence of Physically Associated Non-Protein Nitrogen in Collagenous Proteins. The 407th Meeting of The Biochemical Society, Department of Physiology and Biochemistry, University of St-Andrews, Scotland.
- Steven, F. S. (1964). "The Nishihara Technique for the Solubilization of Collagen. Application to the Preparation of Soluble Collagens from Normal and Rheumatoid Connective Tissue." Ann Rheum Dis **23**: 300-1.
- Steven, F. S. and D. S. Jackson (1967). "Purification and amino acid composition of monomeric and polymeric collagens." Biochem J **104**(2): 534-6.
- Steven, F. S. and G. R. Tristram (1962). "The presence of non-protein nitrogen in acetic acid-soluble calf-skin collagen." Biochem J **83**: 240-4.
- Suzuki, K., Y. Okawa, et al. (1984). "Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis." Microbiol Immunol **28**(8): 903-12.
- Synowiecki, J. and N. A. A. Q. Al-Khateeb (1997). "Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan." Food Chemisrry **60**(4): 605-610.
- Synowiecki, J. and N. A. A. Q. Al-Khateeb (2000). "The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards " Food Chemisrry **68** (2): 147-152.
- Taghizadeh, R. and P. M. Gilbert (2008). "Comparison of commonly used mesher types in burns surgery revisited." Burns **34**(1): 109-10.
- Timpl, R., W. Beil, et al. (1971). "Characterization of conformation independent antigenic determinants in the triple-helical part of calf and rat collagen." Immunology **21**(6): 1017-30.
- Toma, J. G., I. A. McKenzie, et al. (2005). "Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin." Stem Cells **23**(6): 727-37.
- Tortora, G. J. (1994). Principles Anatomy and Physiology, Biological Sciences Textbooks.
- Townsend CM, B. R., Evers BM, Mattox KL (2004). The biological basis of modern surgical practice. Sabiston textbook of surgery. Philadelphia, Elsevier Saunders: 582-3.
- Tremblay, P. L., F. Berthod, et al. (2005). "In vitro evaluation of the angiostatic potential of drugs using an endothelialized tissue-engineered connective tissue." J Pharmacol Exp Ther **315**(2): 510-6.
- Van Gils, C. C., B. Roeder, et al. (1998). "Improved healing with a collagen-alginate dressing in the chemical matricectomy." J Am Podiatr Med Assoc **88**(9): 452-6.
- Varum, K. M., M. M. Myhr, et al. (1997). "In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum." Carbohydr Res **299**(1-2): 99-101.
- Waddock, K., R. M. Olson, et al. (1983). "Evaluation of collagen crosslinking techniques." Biomater Med Devices Artif Organs **11**(4): 293-318.
- Waddock, K. S., E. J. Miller, et al. (1996). "Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions." J Biomed Mater Res **32**(2): 221-6.
- Whistler, R. L. and M. Kosik (1971). "Anticoagulant activity of oxidized and N- and O-sulfated chitosan." Arch Biochem Biophys **142**(1): 106-10.

- Whitaker, I. S., S. Prowse, et al. (2008). "A critical evaluation of the use of Biobrane as a biologic skin substitute: a versatile tool for the plastic and reconstructive surgeon." Ann Plast Surg **60**(3): 333-7.
- White, S. A., P. R. Farina, et al. (1979). "Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*." Appl Environ Microbiol **38**(2): 323-8.
- Wu, A. C., W. A. Bough, et al. (1976). "Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr **128**(1): 87-99.
- Wysocki, A. B. (1999). "Skin anatomy, physiology, and pathophysiology." Nurs Clin North Am **34**(4): 777-97, v.
- Xiaoyan, A., Y. Jun, et al. (2008). "Preparation of chitosan-gelatin scaffold containing tetrandrine-loaded nano-aggregates and its controlled release behavior." Int J Pharm **350**(1-2): 257-64.
- Yan, J., N. Qi, et al. (2007). "Rabbit articular chondrocytes seeded on collagen-chitosan-GAG scaffold for cartilage tissue engineering in vivo." Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol **35**(4): 333-44.
- Yannas, I. V. and J. F. Burke (1980). "Design of an artificial skin. I. Basic design principles." J Biomed Mater Res **14**(1): 65-81.
- Yannas, I. V., E. Lee, et al. (1989). "Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(3): 933-7.
- Yasuda, K. (1953). "Histochemical staining of hyaluronic acid with chitosan." Okajimas Folia Anat Jpn **25**(2): 55-60.
- Yates, D. W. and J. M. Hadfield (1984). "Clinical experience with a new hydrogel wound dressing." Injury **16**(1): 23-4.