

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**ÉVALUATION INTRAMUSCULAIRE D'UNE FORMULE
AUTOGÉLIFIANTE CHEZ LE RAT.**

Olivier Leloup

**INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)**

AVRIL 2001



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file *Voire référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-65587-3

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

**ÉVALUATION INTRAMUSCULAIRE D'UNE FORMULE
AUTOGÉLIFIANTE CHEZ LE RAT.**

présenté par : LELOUP Olivier

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Dr LEROUX Jean Christophe, PhD, président

Dr BUSCHMANN Michael, PhD, membre et directeur de recherche

Dr DESROSIERS Eric, PhD, membre

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier les personnes et institutions qui ont permis de rendre possible ce projet de maîtrise. Je remercie en particulier le Docteur Michael Buschmann qui fut mon directeur de recherche pendant la durée du projet, et le Professeur Amine Selmani qui m'a permis d'effectuer ces travaux de recherches au sein de sa compagnie Bio Syntech Canada Inc.

Je voudrais également remercier chaleureusement les Docteurs Cyril Chaput, Eric Desrosiers, et Matthew Shive pour leur constant soutien tout au long de ce projet. Leur jugement scientifique précis aura permis à l'étudiant inexpérimenté que je fus, et que nous avons tous été (...), de garder en vue des objectifs clairs et bien définis.

Je remercie également les membres du jury pour les corrections éclairées qu'ils auront pu apporter à ce mémoire de maîtrise.

Enfin, je voudrais adresser mes remerciements sincères à l'ensemble du laboratoire de Bio Syntech, passé et présent, qui aura amplement contribué à générer la bonne humeur au sein du groupe pendant tout ce temps.

RÉSUMÉ

Le chitosan est un biopolymère naturel qui depuis quelques décennies suscite de nombreuses recherches. Il présente en effet quelques propriétés fort intéressantes, du point de vue de sa biocompatibilité et de son comportement *in situ*. Parmi les nombreux articles scientifiques concernant ce polysaccharide, on retrouve aussi bien des articles concernant l'évaluation de ses propriétés que des articles plus axés sur des applications bien précises.

Cette étude s'est plus particulièrement concentrée sur l'évaluation de la biocompatibilité de différentes formulations brevetées à base de chitosan et de β -glycérophosphate développées par Bio Syntech Canada, Inc. Cette étude fait intervenir aussi bien des tests *in vitro* que des tests *in vivo*. Ces tests font partie des tests précliniques pré-requis pour l'évaluation de matériaux sur l'homme. Ces tests sont donc fondamentaux car ils permettent de mieux caractériser les biogels pour déterminer si oui ou non, ils peuvent faire l'objet de tests plus spécifiques à l'homme. Deux paramètres ont été évalués en parallèle, le degré de désacétylation des gels ainsi que la forme sous laquelle ils sont préparés, à savoir sous forme injectable, gélifiée ou lyophilisée.

Dans les études *in vivo*, nous avons essayé de caractériser la réaction engendrée par l'introduction de ce matériau *in situ*. Un modèle intramusculaire a été choisi car il était plus approprié à l'implantation de matériaux gélifiés et lyophilisés. La réponse inflammatoire a été étudiée en fonction des différents paramètres que l'on a fait varier. Pour les réactions aiguë et chronique, nous avons étudié qualitativement les populations cellulaires présentes, ainsi que les éléments caractéristiques de la réaction inflammatoire, à savoir, la formation d'une capsule, l'apparition de vaisseaux

sanguins néoformés et la biodégradation du matériau. Les tests *in vitro* nous ont permis de mieux caractériser le comportement du matériau vis-à-vis d'une population cellulaire particulière, présente tout au long de la réaction de l'hôte, et au centre du processus inflammatoire, les macrophages. L'adhésion cellulaire a été étudiée sur des matrices de chitosan gélifiées.

Une solution de β -glycérophosphate fut utilisée afin de tamponner les solutions de chitosan à un pH autour de 7. Un test de libération de glycérophosphate nous a permis de montrer que les gels étudiés avaient une tendance à libérer la quasi-totalité de ce composé chimique, relativement tôt après mise en contact avec un milieu biologique. Ceci nous permet de penser que les matériaux implantés *in vivo* sont composés majoritairement de chitosan. Les tests d'adhésion cellulaire *in vitro* se sont donc attachés, dans un premier temps, à laver correctement les matrices de chitosan gélifiées avant de mettre les cellules en contact avec les gels.

Les études *in vivo* ont montré que le degré de déacétylation avait un rôle central dans l'intensité de la réaction. Un plus haut degré de déacétylation entraîne une réaction plus limitée, et une biodégradation retardée. La reconstruction tissulaire semble plus rapide également pour un plus haut degré de déacétylation. Des polymorphonucléaires ainsi que des macrophages sont présents en surface des gels très tôt après l'implantation. Plus tard, des lymphocytes et quelques cellules géantes sont parfois apparues en surface des gels. Les études ont également montré que les gels implantés sous forme lyophilisée présentaient une réaction retardée et moins intense que les autres formes.

Le test d'adhésion cellulaire n'a pas pu montrer de différence significative d'adhésion entre les deux gels de degré de déacétylation différent. Par contre, on a montré que les gels favorisaient l'adhésion cellulaire des macrophages étudiés par rapport aux surface contrôles en Permanox[®].

Cette étude a donc permis de mieux caractériser les évènements intervenant lors de l'implantation de ce type de biomatériau à base de chitosan en milieu biologique. Elle a également permis de mettre en évidence qu'un gel sous forme lyophilisée présentait une réaction sensiblement moindre. Il pourrait donc être intéressant d'étudier plus en détails cette formulation, sachant que plusieurs auteurs l'utilisent déjà comme comblement osseux, ou comme matrices contenant des molécules thérapeutiques.

ABSTRACT

Chitosan is a natural biopolymer which has been widely studied during the last decades. Indeed, it presents some very interesting features concerning biocompatibility and its *in situ* behavior. Many recent articles deal with the evaluation of chitosan characteristics as well as with precise potential applications.

This study focussed on the evaluation of biocompatibility of some patterned chitosan biogels developed at Bio Syntech Canada, Inc. *In vitro* as well as *in vivo* studies were performed, as they are part of preclinical tests required before any human experimentation consideration. As so, these tests are essential because they give much information related to chitosan characteristics, in order to know whether or not these materials can be part of a medical therapy. Two parameters were evaluated in parallel : the degree of deacetylation and their physical state (injectable, gelled or freeze-dried).

In the *in vivo* studies, the host reaction produced by the *in situ* introduction of chitosan materials was characterized. An intramuscular model was chosen. The inflammatory response was correlated to the different parameters tested. For acute and chronic responses, cell populations, capsule formation, presence of newly formed blood vessels, and the biodegradation of the materials were qualitatively evaluated. The *in vitro* tests allowed us to characterize the behavior of macrophages in contact with chitosan. Macrophages are widely present during the inflammation and healing processes, and their adhesion onto chitosan materials was a key feature of inflammation initiation. Cell adhesion was assessed using gelled chitosan matrix for cell culture.

In order to buffer the solution at a pH around 7, a β -glycerophosphate solution was used. A release test showed a tendency of the gels to release most of β -glycerophosphate when in contact with a biological medium. This made us consider that, after a short initial time period, implanted materials were mostly composed of chitosan with little glycerophosphate. A sufficient washing procedure was then developed in order to eliminate most of the β -glycerophosphate before cell culture.

In vivo studies highlighted the central role played by the degree of deacetylation in the intensity of the host reaction. The higher the degree of deacetylation, the lesser the reaction, and the lesser the degradation. Tissue reconstruction also seemed faster with a higher degree of deacetylation. Polymorphonuclear cells and macrophages can be found on the surface on the gels early after implantation. Later, lymphocytes and little giant cells can be detected on some gels. Freeze-dried gels presented a delayed and less intense reaction.

No significant difference was detected between the gels with different degrees of deacetylation, as far as cell adhesion is concerned. On the other hand, this study showed that chitosan gels could enhance macrophage adhesion onto chitosan surface, compared with Permanox[®] controls.

In this study, the events occurring when Bio Syntech chitosan materials are implanted *in situ* were also characterized. Additionally, freeze-dried gels showed a less intense reaction. It might then be interesting to study more in details this gel state, knowing that it has already been used by different authors for bone defect filling or drug delivery systems applications.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT.....	VIII
TABLE DES MATIÈRES.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES ANNEXES.....	XVI
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTES DES ABRÉVIATIONS FRANÇAISES.....	XVIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ANGLAISES.....	XIX
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	I
1.1 MISE EN CONTEXTE.....	1
1.2.REVUE DES RECHERCHES RÉCENTES.....	3
1.2.1. Composition.....	3
1.2.2.Propriétés.....	4
1.2.2.1. <i>Propriétés chimiques</i>	4
1.2.2.2. <i>Modifications chimiques</i>	5
1.2.2.3. <i>Propriétés biologiques</i>	8
1.2.2.3.1. Formation d'un réseau structuré.....	8
1.2.2.3.2. Propriétés anti-inflammatoires.....	8
1.2.2.3.3. Activation des macrophages et des cellules polymorphonucléaires.....	8
1.2.2.3.4. Production de cytokines.....	10
1.2.2.3.5. Angiogenèse.....	11
1.2.2.3.6. Cicatrices.....	11
1.2.2.3.7. Granulation.....	12
1.2.2.3.8. Épidermisation et kératinisation.....	12

1.2.2.3.9. Activités immunologiques et antibactériennes.....	12
1.2.2.3.10. Dégradation.....	13
1.2.2.3.11. Liaison cellulaire.....	13
1.2.2.3.12. Propriétés ostéoinductrices.....	14
1.2.3. Applications.....	15
1.2.3.1. <i>Génie tissulaire</i>	15
1.2.3.1.1. Réparation tissulaire et peau artificielle.....	15
1.2.3.1.2. Réparation du ménisque.....	17
1.2.3.1.3. Régénération du tissu osseux.....	17
1.2.3.1.4. Matrice pour l'encapsulation de cellules.....	18
1.2.3.2. <i>Systèmes de libération contrôlée</i>	19
1.2.3.3 <i>Cosmétiques</i>	22
1.2.3.4. <i>Agroalimentaire</i>	22
1.2.3.5. <i>Environnement</i>	23
1.3.. Approche expérimentale.....	23
1.3.1. <i>Problématique</i>	23
1.3.2. <i>Tests et design expérimental</i>	24
CHAPITRE 2 : PRODUITS ET MÉTHODES.....	25
2.1. LES SOLUTIONS DE CHITOSAN.....	25
2.2. LES SOLUTIONS DE β -GLYCÉROPHOSPHATE.....	25
2.3. STÉRILISATION.....	25
2.4. PRÉPARATION DES GELS.....	26
2.5. EXPÉRIMENTATION <i>IN VIVO</i>	26
2.6. EXPÉRIMENTATION <i>IN VITRO</i>	27
2.6.1. <i>souches cellulaires et culture de cellules</i>	27
2.6.2. <i>Test de libération de βGP</i>	28
2.6.2.1. But.....	28
2.6.2.2. Manipulations.....	28

2.6.3. <i>Test d'adhésion cellulaire</i>	29
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	32
3.1. BIOCOMPATIBILITÉ <i>IN VIVO</i>	32
3.1.1. <i>Réaction aiguë</i>	32
3.1.2. <i>Réaction chronique</i>	34
3.2. EXPÉRIENCES <i>IN VITRO</i>	42
3.2.1. <i>Test de libération du βGP</i>	42
3.2.2. <i>Test d'adhésion cellulaire</i>	43
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	59
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS	64
BIBLIOGRAPHIE	66
ANNEXES	75

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Structures comparées de la chitine, du chitosan et de la cellulose.....	3
Figure 3.1. Résultats du test de libération du β GP.....	42
Figure 3.2. Résultats du test d'adhésion cellulaire à 48 heures - 91.7DA.....	45
Figure 3.3. Résultats du test d'adhésion cellulaire à 48 heures – 95DA.....	46
Figure 3.4. Pourcentage d'adhésion cellulaire – 91.7DA.....	47
Figure 3.5. Pourcentage d'adhésion cellulaire – 95DA.....	48

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A : SPECTRES RMN DE LA LIBÉRATION DE β GP.....	74
ANNEXE B : RÉSULTATS DES TESTS STATISTIQUES.....	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Principales utilisations du chitosan et de ses dérivés.....	7
Tableau 2.1. Liste des produits et de leur provenance.....	27
Tableau 3.1. Réaction de l'hôte vis-à-vis des différents gels.....	35
Tableau 3.2. Résultats du test de libération du β GP.....	41
Tableau 3.3. Résultats du test d'adhésion cellulaire – 91.7DA.....	45
Tableau 3.4. Résultats du test d'adhésion cellulaire – 95DA.....	46
Tableau 3.5. Pourcentage d'adhésion cellulaire.....	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS FRANÇAISES

89DA :	gel désacétylé à 89%
91.7DA :	gel désacétylé à 91.7%
95DA :	gel désacétylé à 95%
°C :	degré celsius
βGP :	Béta-glycérophosphate
dda :	degré de déacétylation
Glc :	glucosamine
GAG :	glucosaminoglycanes
kDA :	kilodalton
kPa :	kilopascal
IL-1 :	interleukine 1
IL-6 :	interleukine 6
IL-8 :	interleukine 8
LTB4 :	leucotriènes B4
MEC :	matrice extracellulaire
MPC :	5-méthylpyrrolidinone
NAGA :	N-acétylglucosamine
NO :	oxyde nitrique
PMN :	cellules polymorphonucléaires

LISTE DES ABRÉVIATIONS ANGLAISES

BMP :	Bone Morphogenic Protein
FBS :	fetal bovine serum
FGF :	fibroblast growth factor
PBS :	phosphate buffer saline solution

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Mise en contexte

La chitine est un biopolymère que l'on retrouve comme constituant majeur de l'exosquelette de crustacées et d'invertébrés aquatiques (crabe, crevette, calmar, seiche, etc.) et de certains insectes. On la retrouve également dans la structure de certains champignons. Ce biopolymère était traditionnellement utilisé en Orient dans le traitement des abrasions et brûlures, et en Amérique pour soigner les blessures à l'arme blanche.

Plus récemment, il fut introduit dans le domaine biomédical et son utilisation est d'ores et déjà bien connue, mais non plus sous sa forme naturelle. Il peut être désacétylé par traitement chimique ou modifié par ajout de groupements chimiques particuliers qui lui confèrent des propriétés spécifiques (acide carboxylique, acide glutamique, groupement carboxyméthyl, ou sulfate, etc...). Il prend alors le nom de chitosan. Plus soluble dans l'eau que la chitine elle-même, il convient mieux à un développement industriel. Son utilisation touche des domaines aussi variés que l'industrie agro-alimentaire, le traitement des eaux, et l'industrie pharmaceutique. Il est utilisé comme anti-viral pour certains végétaux, comme additif pour les engrais liquides, entre dans la composition de pâtes à papier pour améliorer leurs propriétés mécaniques, comme agent facilitant la formation de films dans les cosmétiques et enfin comme agent hypolipidique dans les régimes amincissants.

Son principal intérêt réside dans le fait que c'est un matériau naturel dont l'abondance réduit le coût de production. Il est également reconnu pour sa non-toxicité et sa biodegradabilité.

En tant que biomatériau, il a montré d'intéressantes propriétés immunostimulatrices, et des activités anticoagulantes, bactéricides, et anti-fongiques, ainsi qu'une faible cytotoxicité⁽¹⁷⁾. Il stimule aussi les phénomènes intervenant dans la cicatrisation des plaies. Récemment, des chercheurs se sont intéressés à ses propriétés d'absorption et de relargage contrôlé de substances médicamenteuses ou autres.

Depuis plus de 20 ans, de nombreux articles ont été publiés sur ce polymère et ses applications potentielles, ainsi que les modifications chimiques possibles. Bio Syntech Canada Inc a développé une méthode de fabrication originale, brevetée, d'un gel à base de chitosan, dont le pH varie autour de 7.0, liquide à 4°C et qui gèle rapidement une fois mis à 37°C ⁽¹⁾. Ces propriétés particulières trouvent des applications dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et des systèmes de libération contrôlée de médicaments ou de vaccins.

L'objet de cette maîtrise est d'évaluer les propriétés de biocompatibilité de gels à base de chitosan, sous différentes formes. La première partie passera en revue l'étendue des recherches concernant le chitosan afin de présenter l'intérêt du chitosan comme biomatériau. La deuxième partie présentera les recherches effectuées lors de cette maîtrise.

1.2. Revue des recherches récentes concernant le chitosan.

1.2.1. Composition

La chitine est un poly- $\beta(1\rightarrow4)$ -N-acétyl-D-glucosamine (Fig.1) Pendant le processus de désacétylation, le groupement acétyle est remplacé par une amine primaire. Ainsi, les caractéristiques finales du polymère dépendent fortement de son degré de désacétylation (dda) et du pH, dont sont fonction son degré de protonation, sa viscosité, ses propriétés d'adhésion et son poids moléculaire. L'introduction d'une amine primaire dans la structure permet des liaisons potentielles avec d'autres groupes fonctionnels. Le chitosan est reconnu pour sa faible immunogénicité, en dépit du groupe aminé qu'il comporte.

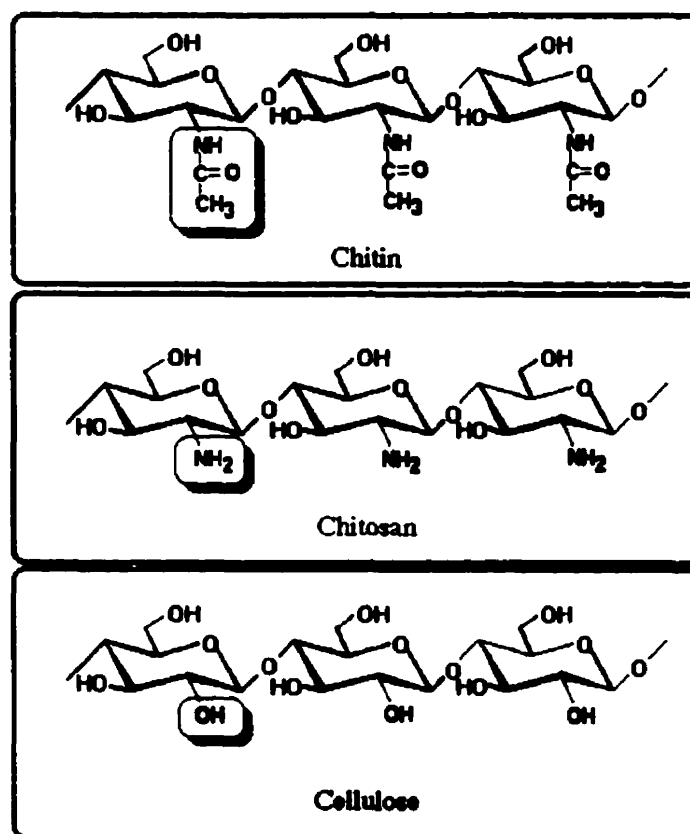


Fig. 1.1 : Structures comparées de la chitine, du chitosan et le la cellulose⁽⁶⁶⁾.

La chitine un polymère qui a, comme la cellulose, une fonction de polysaccharide structural. Elle est en outre très similaire à ce polymère puisqu'elle n'en diffère que par

un groupe acétamide remplaçant un groupe hydroxyle en C-2 (Fig.1.1). Comme la cellulose, il est très soluble et présente une faible réactivité chimique⁽³⁴⁾.

Une des caractéristiques très attrayantes de la chitine est sa charge positive due à sa basicité. Cela la différencie des autres polymères naturels que l'on rencontre habituellement comme le dextrane, la cellulose, la pectine, l'alginate, l'agarose, et le carraghénate, etc. qui sont soit neutres, soit acides. Cette caractéristique quasi unique lui confère la propriété de se lier à des molécules anioniques, de chélater des ions métalliques, de former des films polymères, et lui confère également d'intéressantes propriétés optiques. Il est à noter que l'on retrouvera cette possibilité d'interagir avec des molécules chargées négativement (héparine, protéines, etc.) associée à de nombreuses propriétés biologiques, comme par exemple ses propriétés anti-bactériennes ou sa faculté de créer un agrégat érythrocytaire.

Enfin, il faut remarquer qu'il est également possible d'envisager une liaison de la chitine et de ses dérivés à des molécules chargées positivement. En effet, les anions qui établissent des interactions de types électrostatiques avec la surface du biopolymère créent, par ce fait, une nouvelle surface de recouvrement qui est alors chargée négativement. Ces anions, présents en grand nombre dans les milieux physiologiques, deviennent alors des contre-ions, qui offrent une portion de surface négative, permettant de lier des molécules chargées positivement. Ces considérations seront reprises dans le détail lorsque l'on discutera des propriétés de surface du chitosan quant à l'adhésion cellulaire. Ceci constitue en effet une part importante des recherches effectuées lors de cette maîtrise, notamment en ce qui concerne la partie *in vitro*.

1.2.2. Propriétés

1.2.2.1. Propriétés chimiques

Le chitosan est insoluble dans les solutions alcalines et les solvants organiques, alors qu'il est soluble dans les solutions acides dont le pH est inférieur à 6. Il a été montré

qu'avec un degré de désacétylation de 50% ou plus, le polymère pouvait être soluble dans l'eau, ce qui peut être une propriété intéressante pour des applications où la présence d'acides est indésirable, comme dans les cosmétiques, le domaine médical ou dans l'agro-alimentaire.

Le poids moléculaire de la chitine est habituellement supérieur à 10^6 , alors que les produits commerciaux dérivés du chitosan ont un poids moléculaire autour de 10^5 à $1,2 \cdot 10^6$. Le poids moléculaire est souvent déterminé par viscosimétrie ou par chromatographie d'exclusion stérique. La viscosité du chitosan est fonction du dda, du poids moléculaire, de la concentration, du pH, de la force ionique et de la température. Elle diminue si le polymère est chauffé, mais il ne retrouve pas sa viscosité initiale en refroidissant. Ce n'est pas un processus réversible car il augmente l'élasticité des chaînes.

Le chitosan a également des propriétés pro-coagulantes dues à la densité de groupes aminés qui peuvent interagir avec les substances chargées négativement, comme les protéines.

Le groupe $-NH_2$ peut également agir comme donneur d'électrons. Il est ainsi supposé être responsable des propriétés de chélation des ions métalliques. On considère généralement que le groupe amine primaire est meilleur chélateur d'ions métalliques que le groupe acétyle. Cependant, les propriétés d'adsorption sur les protéines ne sont pas simplement fonction du dda, il dépend aussi de la cristallinité, de l'affinité du polymère pour l'eau et de sa structure. Les propriétés d'adsorption peuvent être augmentées par réticulation ou complexation avec d'autres polymères comme le glucane. Le copolymère chitosan-glucane présente une grande affinité de liaison aux ions métalliques (Cr, Co, Ni, Cu, Pb, Cd, etc.)

Le chitosan est reconnu pour sa capacité à pouvoir former des films, des fibres ou des microfibrilles⁽³⁴⁾ élastiques ayant une bonne résistance à la rupture. Enfin, le chitosan n'est pas un polymère inerte, il se dégrade dans le temps, en fonction du dda et du milieu environnant, essentiellement par voie enzymatique.

1.2.2.2. Modifications chimiques

Le chitosan est souvent utilisé soit comme copolymère, soit après avoir subi des modifications de structure chimique, par remplacement ou ajout de groupes fonctionnels. Par exemple, le N-carboxymethyl-chitosan est utilisé pour se lier ioniquement à d'autres molécules⁽¹¹⁾. Le chitosan hydrophobe est utilisé pour remplacer les lipides ou pour former des structures lipidiques avec une faible cytotoxicité. Le chitosan cationique est utilisé pour se lier à l'ADN, comme système de libération contrôlé dans la thérapie génique. Le tableau suivant résume les principales applications du chitosan en fonction de ses modifications chimiques et de la forme sous laquelle il est utilisé (voir Mattioli-Belmonte M. *et al.*, Carbohydrates in Europe, Déc. 1997, p:30-36.)

Tableau 1.1 : Principales utilisations du chitosan et de ses dérivés.

Forme	Exemple d'application clinique
Chitosan	
Fibres tissées	Abcès, morsure, contusion, lacération, gangrène, infection chirurgicale
Éponge composite avec des matériaux non tissés	Les mêmes que plus haut, et également comblement d'un défaut de peau, tumeur mammaire, stomatite
Film	Plaie chirurgicale, plaie de la cornée, système de libération contrôlé
Microparticules et comprimés	Libération contrôlée
Comprimés et capsules	Régime amincissant
Chitosan modifié	
Methylpyrrolidinone chitosan (MPC)	Comblement osseux, implant dermo-epidermal, régénération du ménisque
N-Carboxybutyl chitosan	Régénération du ménisque
Dicarboxymethyl chitosan	Comblement osseux

1.2.2.3. Propriétés biologiques.

1.2.2.3.1. Formation d'un réseau structuré

Les cellules mésenchymateuses créent un réseau tridimensionnel bien structuré en présence de chitosan. Généralement, il est non-différencié, mais peut présenter des caractéristiques endothéliales⁽⁴⁾.

1.2.2.3.2. Propriétés anti-inflammatoires

La chitine accélère la phase précoce de la réparation tissulaire, pendant laquelle le processus d'inflammation est accompagné d'une infiltration de cellules mononucléées et de polymorphonucléaires sans présence d'effets secondaires comme une douleur ou une élévation de température. De nombreuses études histologiques *in vivo* appuient le fait que les fibres de chitosan stimulent la migration de ces cellules (voir paragraphe suivant).

1.2.2.3.3. Activation des macrophages et des cellules polymorphonucléaires (PMNs)

Il a été montré que des macrophages obtenus à partir du péritoine d'animaux de laboratoire étaient activés par des dérivés de la chitine. Par exemple, le chitosan a montré des propriétés anti-tumorales par activation de macrophages et production de cytokines, d'oxyde nitrique (NO) et d'enzymes relarguées dans le milieu environnant^(26,27). Il potentialise la réponse immunologique en interagissant avec les cellules immunitaires. Il a été suggéré que le chitosan interagissait avec les saccharides présents sur la membrane plasmique des macrophages, comme le fucose ou le mannose, ce qui induirait son interiorisation dans le cytoplasme cellulaire. Des récepteurs spécifiques pour le mannose et la N-acétylglucosamine ont été identifiés à la surface des macrophages⁽³⁷⁾. Le polymère

est ensuite dégradé par le lysozyme et la N-acétylglucosaminidase présents dans des vacuoles cytoplasmiques. On peut noter que des études ont montré le rôle activateur des produits de dégradation du chitosan comme la N-acétylglucosamine et le D-Glucosamine⁽³⁵⁾. Elles ont montré que ce dernier était principalement responsable de l'attraction chimiocinétique et chimiotactique, alors que la N-acétylglucosamine n'a qu'un effet chimiotactique sur les PMNs. Une autre étude s'est intéressée à différents N-acétylchito-oligosaccharides⁽³⁶⁾ et a montré que l'attraction était une fonction croissante du poids moléculaire et dépendait de l'oligosaccharide attaché au chitosan.

Le chitosan induit également une production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages. Le NO intervient ensuite dans de nombreux phénomènes lors de la réponse immunitaire, au niveau physiologique ou pathologique. Certains travaux se sont attachés à montrer l'importance du NO dans la cytotoxicité des macrophages⁽²⁸⁾. Il a été montré que la cytotoxicité tumorale des macrophages pouvait être inhibée de façon dose-dépendante par un inhibiteur de la synthèse de NO, la N^G-monométhyl-L-arginine⁽²⁹⁾. De plus, l'activité cytotoxique des macrophages était directement corrélée à l'induction de NO. Cependant, la sécrétion de NO par les macrophages activés pourrait également avoir certains effets secondaires indésirables en terme de biocompatibilité. Le NO pourrait amplifier la réaction inflammatoire en contribuant à la destruction du polymère et des tissus environnants. Cette amplification peut intervenir dans l'induction d'une réaction inflammatoire chronique et retarder la réparation tissulaire. Une étude *in vivo* récente renforce cette idée en identifiant par microscopie électronique la présence de nombreux leucocytes 14 jours après implantation, associée à une réparation tissulaire faible (peu de croissance fibroblastique et peu de déposition de collagène)⁽²²⁾. Les auteurs ont considéré que l'activation des macrophages pour synthétiser du NO était principalement due au N-acétylglucosamine, et en moindre mesure au D-glucosamine. Ils proposent que la biocompatibilité du chitosan observée après 60 jours⁽³⁰⁾ pourrait être due à la dégradation totale du chitosan qui normaliserait les processus de cicatrisation à long terme.

Enfin, une étude réalisée sur le chien a montré que le surnageant de PMNs cultivés en présence de chitine ou de chitosan était chimioattractant pour les PMNs, et

contenait suffisamment de LTB₄ pour accélérer la migration cellulaire des PMNs *in vitro*⁽²⁵⁾. On sait de plus que la chitine et ses dérivés activent les fibroblastes indirectement pour qu'ils produisent l'IL-8⁽²⁾, et que la N-acétylglucosamine et la D-glucosamine sont directement chimioattracteurs pour les PMNs⁽³¹⁾. Le chitosan et la chitine jouent également un rôle d'activateur du complément par la voie alterne⁽²³⁾. En effet, la production de C3 et de C5 augmente en présence de chitosan principalement, et de chitine dans une moindre mesure. Ces anaphylatoxines jouent un rôle majeur dans les phénomènes inflammatoires puisqu'elles sont responsables du chimiotactisme, des phénomènes de douleur associés, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, et de la lyse cellulaire. Par contre, la présence de chitine ou de chitosan n'est jamais accompagnée de phénomènes inflammatoires tels que fièvre, formation d'abcès ou érythème. Il semble donc que la chitine et ses dérivés, en parallèle avec leur effets pro-inflammatoires, présenteraient des effets anti-inflammatoires qui mériteraient d'être étudiés plus en détail. Cette étude a enfin montré qu'il fallait utiliser chez le chien une dose 5 fois supérieure à celle administrée chez la souris pour obtenir une réponse équivalente. Cette observation sous-entend que la sensibilité au chitosan varie d'une espèce à l'autre.

Ainsi, les propriétés d'immunoadjuvant et d'activateur cellulaire du chitosan initient le processus de défense de l'hôte, qui le protège contre une infection microbienne ou contre la formation de noyaux tumoraux. Le degré de désacétylation du chitosan apparaît un facteur clé dans l'intensité de la réaction immunitaire qu'il engendre chez l'hôte.

1.2.2.3.4. Production de cytokines

De nombreux articles ont été consacrés à l'étude de la production de cytokines par des macrophages de péritoine de rats activés par des dérivés du chitosan. On a observé que l'exsudat pris dans la zone d'implantation de la chitine présentait une augmentation de la quantité d'interleukine 1 (IL-1) et de TNF- α par rapport aux contrôles⁽⁴⁾. Ceci a une

importance si l'on se souvient que ces cytokines, comme le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) accélèrent le processus de granulation.

Les dérivés de la chitine accélèrent indirectement la croissance de fibroblastes L929 en formant un complexe avec l'héparine qui, outre ses fonctions d'anticoagulant et de facteur angiogène, stabilise le FGF⁽²⁾. Les auteurs suggèrent que l'accélération des phénomènes de réparation tissulaire observés pourraient être dus aux propriétés de l'héparine liée aux dérivés de la chitine. De même, cette étude a montré que la chitine et ses dérivés ne stimulaient pas directement la production d'IL-1, IL-6 et de TNF- α par les fibroblastes. Il semblerait que l'activation indirecte des fibroblastes par la formation du complexe chitine (ou dérivé)-héparine entraîne un relargage d'IL-8 par les fibroblastes. IL-8 est connu pour être un facteur chimioattracteur pour les PMNs et les cellules endothéliales. Il est également angiogène⁽²⁰⁾. La présence de PMNs ainsi que l'activation des fibroblastes par IL-8 entraînent une production indirecte d'IL-1, IL-6 et de TNF- α par les fibroblastes et les PMNs⁽²⁾.

1.2.2.3.5. Angiogénèse.

L'évolution de lésions comblées par de la chitine ont été suivies dans le temps^(26, 4). Un examen morphologique du site de lésion a montré une vascularisation accélérée lors du processus de réparation tissulaire. Le tissu de granulation nouvellement formé présente de nombreux vaisseaux, ce qui ne se retrouve pas dans les essais témoins. D'autres auteurs semblent admettre également cette propriété comme étant bien établie pour la chitine et ses dérivés⁽³⁹⁾.

1.2.2.3.6. Cicatrices.

La formation de cicatrices est fortement corrélée à l'équilibre entre le catabolisme et la synthèse continue de collagène. C'est un point critique de la réparation tissulaire, qui

visé à minimiser les traces d'opération ou de blessure. L'activation *in vivo* des fibroblastes par le chitosan a été rapportée, parallèlement à une réduction de la taille de la cicatrice⁽²⁾. Plusieurs articles rapportent une augmentation de la force de tension mesurée sur la plaie⁽⁴⁾. Elle semble indépendante de la production de collagène, ce qui sous-entend que la N-acetylglucosamine pourrait servir de substrat incorporé dans les tissus de réparation, sans être associée à une réaction inflammatoire excessive. Cependant, la présence d'histiocytes a été observée au site d'injection du chitosan, accompagnée d'une augmentation de la production de fines fibres de collagène. Elle pourrait être induite par le chitosan, entraînant ainsi la production de collagène par les fibroblastes. En revanche, des fibres de collagène épaisses et peu d'histiocytes sont rapportés dans les contrôles^(4,38).

1.2.2.3.7. Granulation

La chitine induit la formation de tissu de granulation sain dès les premiers stades de la réparation tissulaire, bien que le mécanisme associé à ce phénomène ne soit pas encore totalement élucidé. Ce type de tissu de granulation se développe généralement en l'absence de corps étranger (bactérie, débris, etc). Le chitosan semble induire une granulation plus développée que la chitine⁽⁴⁾.

1.2.2.3.8. Épidermisation et kératinisation

Les preuves expérimentales abondent pour montrer que la chitine active la production de kératine par les kératinocytes, permettant ainsi une régénération rapide de la peau lésée. Par exemple, dans le traitement des grands brûlés, la chitine intervient pour soulager le patient de la douleur, et favorise une bonne épidermisation sans laisser de grosse cicatrice et sans perturbation fonctionnelle. Dans le traitement de maladies purulentes des doigts, une ré-épithélialisation rapide est observée avec un temps de convalescence minimal, et sans recours aux antibiotiques⁽⁴⁾.

1.2.2.3.9. Activités immunologiques et antibactériennes

Les dérivés modifiés de la chitine, incluant le chitosan, la carboxymethylchitine, ont montré des activités immunologiques intéressantes. Alors qu'une poudre de chitine, de chitosan ou de carapace de crabe sont sans effet, une solution de chitosan dissous dans un acide inhibe la prolifération de souches bactériennes⁽²⁶⁾ et de champignons⁽⁴⁾. Il a été proposé que le groupement cationique aminé du chitosan pourrait se combiner aux groupes chargés négativement présents dans la membrane cellulaire de ces organismes, comme l'acide N-acétylmuramique ou l'acide N-acétylneuraminique. Ceci aurait pour conséquence de modifier les échanges avec le milieu et d'empêcher leur croissance⁽⁶⁵⁾. D'autre part, le chitosan peut chélater les ions métalliques nécessaires aux enzymes et ainsi les inactiver.

1.2.2.3.10. Dégradation

La chitine, le chitosan ainsi que certains dérivés de la chitine comme la N-carboxymethylbutylchitine ou la 5-méthylpyrrolidinone (MPC) sont sensibles aux lysozymes⁽³⁹⁾. La N-acétylglucoasaminase et certaines lipases agissent également sur le chitosan et la chitine⁽⁶⁷⁾. La diminution de viscosité associée à la dégradation du polymère est une fonction linéaire de la température et est indépendante de la concentration initiale du substrat. Par contre, certains analogues synthétiques de la chitine, comme l'acétamidodéoxycellulose, et l'aminodéoxycellulose ne sont pas sensibles aux lysozymes et aux chitinases. Le degré d'organisation du polymère est un autre facteur intervenant dans sa susceptibilité à la dégradation par les lysozymes. Un polymère cristallin sera moins sensible à l'enzyme qu'un polymère plus amorphe.

La dégradation du chitosan par cette batterie d'enzymes libère des chitooligomères pouvant activer directement les macrophages et indirectement les

fibroblastes⁽²⁾ dans leurs fonctions, comme nous l'avons vu plus haut. Monomères et oligomères sont également disponibles pour être intégrés dans les composants de la matrice extracellulaire, aidant ainsi à la reconstruction des tissus.

1.2.2.3.11. Liaison cellulaire

Le chitosan se lie facilement à de nombreux types cellulaires (cellules mammifères, microbes, etc.). Cette propriété est associée à des propriétés hémostatiques, bactériostatiques, spermicides et anti-tumorales. Dans les années 50, les possibilités d'interactions des polycations avec les membranes cellulaires ont été décrites abondamment⁽¹²⁾, principalement avec les globules rouges. De nombreuses études démontrent que ces matériaux entraînent une agglutination des globules rouges, ce qui explique l'activité hémostatique du chitosan⁽¹⁷⁾. Elle est indépendante des réactions intervenant dans la formation d'un caillot sanguin. Le résultat est un enchevêtrement de cellules dans un réseau de chaînes de polymère interreliées. Cette activité dépend également du poids moléculaire du polymère. En effet, un polymère de faible poids moléculaire est incapable d'entraîner la formation d'un agrégat érythrocytaire.

Il est bien connu que la force de répulsion naturelle des globules rouges entre eux est liée à la charge nette négative de leur membrane cellulaire, due à la présence d'acide neuraminique sur la surface. Un traitement de la surface des globules rouges par des neuraminidases enlève ces résidus membranaires et rend la surface neutre et insensible à la présence de chitosan. Il a été montré que le chitosan interagissait avec les globules rouges par l'intermédiaire de ces résidus négativement chargés⁽¹⁷⁾.

1.2.2.3.12. Propriétés ostéoinductrices

Une étude récente a évalué la réparation de défauts osseux pratiqués chez le lapin au niveau du tibia, et comblés par du MPC lyophilisé⁽²⁴⁾. L'observation histologique à 60

jours a identifié la présence de tissus osseux néoformés plus abondants que dans les contrôles. La nature cationique du chitosan et sa faculté à lier les anions, comme les ions phosphates, semblent avoir favorisé la minéralisation. Les précurseurs des ostéoblastes, peut être stimulés par les facteurs de croissance emprisonnés dans le réseau matriciel, ont donné naissance à des tissus minéralisés de type osseux. La présence de chitosan double quasiment la quantité de colonies de cellules osseuses formées, et favorise la différenciation des cellules ostéoprogénitrices, aidant ainsi à la formation de nouveau tissu osseux^(8,68). Des expériences *in vivo* encourageantes ont tenté de coupler un dérivé du chitosan avec la BMP (*Bone Morphogenic Protein*), qui joue un rôle important dans les phénomènes de remodelage des os et du cartilage^(53,54). Les résultats obtenus soulignent l'intérêt d'une approche biochimique pour la correction thérapeutique des pathologies articulaires, dont l'ostéoporose est un des exemples les plus représentatifs.

1.2.3. Applications

1.2.3.1 Génie tissulaire

1.2.3.1.1. Réparation tissulaire et peau artificielle

La réparation tissulaire consiste en une série de processus biophysiques complexes régulés par différents facteurs humoraux et médiateurs anti-inflammatoires. Dans le cas de la régénération de la peau, l'ensemble de ces processus aboutissent à la reconstruction des tissus cutanés et sous-cutanés, garantissant une protection naturelle contre les facteurs externes, autant physiques (rayonnements, etc.) que biologiques (infection, etc.) Les facteurs de régulation incluent des facteurs immunologiques dont l'action peut-être décisive, notamment lors des phases précoces de l'inflammation.

Brièvement, la suite d'événements qui a lieu peut se résumer en trois phases de la manière suivante : dans un premier temps, des cellules inflammatoires venant des tissus environnants affluent vers le site de la lésion. Il s'agit principalement de PMNs et de granulocytes-macrophages. Puis les fibrocytes arrivent sur le site de la lésion par

attraction chimiotactique, où ils prolifèrent et se différencient. Ils produisent la matrice extracellulaire, principalement constituée de collagène, de protéoglycanes et d'élastine, participant ainsi à la mise en place d'un nouveau tissu conjonctif qui procurent une force de tension nécessaire à la nouvelle peau. Simultanément, de nombreux capillaires sanguins et lymphatiques se constituent. Ils approvisionnent le site de lésion en nutriments, en cellules et en oxygène. Ce phénomène est connu sous le nom d'angiogénèse. Des cellules épithéliales commencent à combler l'espace entre la croûte et les tissus néoformés. Dans la troisième et dernière phase, le nouvel épithélium se forme et redonne à la peau sa fonctionnalité.

Les patients souffrant d'une perte abondante de peau ont besoin d'une protection provisoire contre le milieu extérieur et ses agressions éventuelles. Ils ont également besoin d'une barrière contre les pertes d'eau abondantes lors d'une brûlure. Le chitosan a été proposé comme inhibiteur de fibroplasie et comme activateur de croissance cellulaire pour aider à la reconstruction tissulaire^(4,8,38,40). Le British Textile Technology Group a breveté une procédure de fabrication de fibres à base de chitine provenant de champignons, dont la structure est radicalement différente des fibres habituelles, obtenues à partir de chitine de crustacées. Elles sont plus ramifiées et ont une structure plus irrégulière⁽⁴¹⁾. Elles sont également plus cassantes et doivent être associées à des plastifiants. En général, les dérivés de la chitine étudiés accélèrent les processus de réparation tissulaire et laissent une cicatrice plus estompée, moins visible. Le chitosan assure une néovascularisation suffisante et un apport en chitooligomères continu qui stimule la déposition, l'assemblage et l'orientation correcte des fibrilles de collagène incorporées dans la matrice intracellulaire. Ces chitooligomères sont relargués par l'action hydrolytique de la N-acétyl- β -D- glucosaminidase et du lysozyme⁽³⁹⁾. Il a été montré que le chitosan activait la production d'interleukine 1 par les macrophages. Cette cytokine a un rôle de facteur de croissance pour les fibroblastes, et parallèlement, elle entraîne leur maturation pour qu'ils produisent du collagène. De plus, le chitosan et ses dérivés carboxylés ont montré des propriétés immunologiques et anti-bactériennes en

milieu acide, ce qui contribue à la protection des tissus pendant la reconstruction de la peau lésée.

Des patients opérés pour chirurgie plastique ont été traités par du MPC mis directement au contact des plaies. La zone de contact présentait toutes les caractéristiques requises pour une bonne protection contre les infections. De plus, on observe une bonne organisation histoarchitecturale, une meilleure vascularisation et une absence de cellules inflammatoires au niveau dermique, par rapport aux contrôles⁽⁸⁾.

Un exemple type de peau artificielle constituée de chitosan complexée avec des fibres de collagène de type I et III, ainsi qu'avec de la chondroïtine 4- et 6-sulfate a été évalué (collagène :72%, chondroïtine sulfate :20%, aminoglycanes :8%)⁽⁴⁾. La réticulation entre le groupement amine primaire du chitosan et le groupe sulfate semblait essentiel au complexe pour conférer de bonnes caractéristiques mécaniques et rendre la membrane insoluble. Sur la face "dermale", des fibroblastes étaient inclus, et des kératinocytes étaient présents sur la face "épidermale". Ces derniers furent exposés à l'air avant leur utilisation, ce qui a induit la différenciation des couches superficielles, qui développa une peau protectrice contenant les diverses couches d'une peau normale, notamment la stratum corneum. Diverses protéines furent exprimées (filagrine, kératine, etc.) et une structure similaire à la membrane basale se constitua. Le chitosan joua le rôle de barrière protectrice pendant que la peau se constituait, tout en augmentant la production de collagène et de facteurs de régulation par les fibroblastes, et en permettant une bonne adhésion de la membrane sur la plaie. Il permit en outre la revascularisation de la zone lésée et sa colonisation par les fibroblastes. Le résultat fut la formation d'une matrice organisée présentant un tissu de granulation limité et une cicatrice plus élastique et moins fibreuse, ayant retrouvé une perméabilité plus normale et dont l'aspect final était plus esthétique.

1.2.3.1.2. Réparation du ménisque

La réparation du ménisque est en général assez difficile. Une étude a montré que le chitosan était bien toléré au niveau de la synovie articulaire⁽⁴⁾. Les processus de régénération ont été favorisés et accélérés, alors que cette réparation est quasiment inexistante spontanément. L'action angiogène du chitosan a été proposée pour aider à l'apport de nutriments et de facteurs humoraux nécessaires à la régénération tissulaire⁽⁸⁾. Des incisions radiales ont été faites au niveau du ménisque interne chez le lapin et traitées par une solution de MPC. Quarante cinq jours après l'opération, des éléments caractéristiques de la réparation tissulaire ont pu être observés, à savoir, la présence de microvaisseaux et la formation de faisceaux de collagène en direction du tissu cartilagineux constitutif du ménisque.

1.2.3.1.3. Régénération du tissu osseux⁽¹²⁻¹⁴⁾

Des études *in vivo* faites chez le lapin et le mouton ont montré que le chitosan modifié, à savoir le MPC, favorisait la régénérescence du tissu osseux^(24,8). Chez l'homme, les plaies laissées par l'opération chirurgicale des dents de sagesse ont été traitées par du MPC lyophilisé sous forme d'éponge⁽⁸⁾. L'observation radiologique des plaies et les biopsies faites présentaient une croissance des tissus osseux, comblant les espaces vides laissés par l'opération, et conférant ainsi les propriétés mécaniques et physiologiques requises pour une bonne cicatrisation.

Le MPC a également été utilisé avec succès pour le traitement des apicectomies chez l'homme, sans qu'aucune complication ultérieure ne soit rapportée après trois années de suivi médical⁽⁸⁾.

Enfin, les propriétés du chitosan comme ostéoinducteur⁽⁶⁸⁾ ont été associées à celles décrites dans le domaine des systèmes de libération contrôlée. Le chitosan a été couplé à une protéine favorisant la formation osseuse, la BMP (*Bone Morphogenic Protein*). Sa biodégradation a entraîné une libération continue de la protéine, favorisant la formation de tissu osseux⁽¹¹⁾.

Le MPC apparaît donc comme un bon biopolymère pour aider à la réparation des tissus osseux consécutivement à une chirurgie osseuse et pour le comblement des fractures osseuses. Ces résultats confirment également l'intérêt d'une thérapeutique de type biochimique dans le traitement des pathologies osseuses chez les personnes âgées.

1.2.3.1.4. Matrice pour l'encapsulation de cellules

L'encapsulation de cellules est un domaine en plein essor dans le génie tissulaire pour le développement d'organes artificiels. De nombreux complexes polymères sont évalués pour maintenir des cellules viables et fonctionnelles en culture, avec une faible cytotoxicité à la fois pour les cellules encapsulées et pour les tissus où sont implantées les xénogreffes. Des microcapsules d'alginate couplées à la poly-L-lysine ont été traitées avec un mélange de chitosan et de glutaraldéhyde comme agent réticulant, ce qui a amélioré leur stabilité mécanique tout en leur conservant une bonne perméabilité⁽¹⁵⁾. De plus, l'utilisation de Polyéthylène glycol pour enrober les microcapsules permet de réduire l'adsorption de protéines sur la surface des microcapsules et l'adhésion cellulaire, limitant ainsi les phénomènes thrombogéniques et inflammatoires.

Une autre étude s'est intéressée au rôle d'adjuvant joué par le chitosan dans la préparation de matrice d'alginate pour l'encapsulation de cellules⁽⁹⁾. Les auteurs ont montré que le chitosan aidait à l'immobilisation des cellules adhérentes à l'intérieur du complexe polymère. Il améliore également sensiblement la viabilité des cellules encapsulées.

1.2.3.2. Systèmes de libération contrôlée

Le chitosan est sensible à plusieurs enzymes⁽³⁹⁾, il est donc biodegradable. De plus, il présente des propriétés anti-ulcère et anti-acide, ce qui en fait un candidat potentiel pour les systèmes de libération contrôlée de médicaments ou pour d'autres types de molécules (protéines, ADN, etc.), notamment par voie orale. L'efficacité du système

dépend du médicament contenu dans la matrice de chitosan, de la masse moléculaire du chitosan, du pH, et de l'agent réticulant^(47,48). En particulier, un haut degré de réticulation entraîne une diminution de perméabilité et ralentit la libération de l'agent thérapeutique.

Diverses molécules ont été incorporées dans des microsphères de chitosan pour étudier leur cinétique de libération, tels l'albumine sérique bovine et le toxoïde de la diphtérie (DT)⁽⁴²⁾. Jameela *et al* ont étudié la biocompatibilité *in vivo* de microsphères de chitosan chargées de DT. Ils ont observé qu'elles engendraient une faible production d'anticorps sur 5 mois, et que le taux de relargage, après un pic initial, suivait une cinétique d'ordre 1. Le pic initial a pu être contrôlé par enrobage des microsphères par une couche d'huile de paraffine ou de poly(acide-L-lactique). Un point important est que les microsphères n'étaient pas dégradées en totalité après six mois d'implantation. Le chitosan est par conséquent un bon candidat pour les systèmes de libération contrôlée agissant sur une longue période. De plus, des bisphosphonates incorporées à des microsphères ont été implantées dans le muscle tibialis chez le rat présentant des conditions pathologiques de destruction osseuse⁽⁴²⁾. Le relargage de médicaments agissant contre la calcification et la résorption osseuse ont effectivement inhibé la calcification des bioprothèses implantées.

L'administration orale de médicaments est sans doute la voie non-invasive la plus commune et la plus pratique, particulièrement pour le traitement de pathologies chroniques. Cependant, la densité de l'épithélium gastrointestinal et la présence de protéases dans le tractus gastrointestinal constituent les barrières principales à l'efficacité de plusieurs médicaments. C'est pourquoi de nombreuses stratégies ont été proposées pour contrecarrer ces difficultés. Le chitosan a, par exemple, été étudié comme système de libération en raison de sa sensibilité au pH. Il faut rappeler que le pH intestinal est voisin de 5-6, alors que le pH buccal, est proche de 7. Remuñán-Lopez *et al* rapportent l'utilisation du chitosan pour deux systèmes de libération contrôlée microparticulaires⁽⁴³⁾. Dans le premier cas, de l'amoxicilline est incorporée à des microparticules de chitosan et délivrée au niveau de la cavité gastrique. Les auteurs proposent que les particules adhèrent à la paroi stomacale et aident au traitement des ulcères gastriques causés par

helicobacter pylori. Dans le deuxième cas, du sodium de diclofénac, anti-inflammatoire reconnu, est incorporé dans des particules de chitosan et enrobé dans un polymère acrylique entérique. Les études *in vivo* ont montré que la cinétique de libération est fonction du pH. Selon les auteurs, les particules passent la barrière stomacale sans être dégradées du fait de l'enrobage par des polymères acryliques. Ils se dissolvent une fois l'intestin atteint et les microparticules de chitosan adhèrent à la muqueuse où le médicament est libéré. Le chitosan est connu pour ses bonnes propriétés d'adhésion à la paroi muqueuse, et ceci est d'autant plus vrai pour les polymères de haute masse moléculaire.

Takeushi *et al* ont combiné les propriétés mucoadhésives du chitosan aux propriétés de libération contrôlée des liposomes⁽⁴⁴⁾. Des liposomes contenant de l'insuline ont été enrobés de chitosan pour augmenter l'absorption entérale de l'insuline. La mucoadhésion a été testée *in vitro*, et des particules ont été administrées oralement *in vivo* chez le rat à l'aide d'un tube intragastrique afin de tester l'absorption. Un lien a été établi entre la concentration en chitosan de l'enrobage et la mucoadhésion, à savoir une meilleure adhésion pour les concentrations élevées. Dans ce cas, l'absorption de l'insuline a été améliorée.

Le chitosan a également été utilisé comme excipient pour aider à la dissolution de drogues peu solubles et pour favoriser une libération continue⁽⁴³⁾. Des films de chitosan-glutamate ont servi à enrober des comprimés utilisés dans la libération contrôlée de médicaments pour améliorer les caractéristiques de libération. Les tests *in vitro* ont montré de bonnes propriétés de gonflages et une bonne perméabilité, dépendant fortement du pH et de la concentration de l'agent réticulant. Ces études montrent l'intérêt de ce polysaccharide comme film d'enrobage fonctionnel dans le domaine pharmaceutique.

L'indométhacine est un anti-inflammatoire qui inhibe la cyclooxygénase, impliquée dans la synthèse des prostaglandines. Des granules à libération retardée ont été préparés à partir de chitosan de 3800kDA. La drogue et le chitosan forment un complexe soluble dont la stabilité est due aux forces ioniques et aux interactions hydrophobes⁽³⁹⁾. L'absorption par la muqueuse orale était supérieure quand le médicament était associé au

chitosan. La libération retardée est due aux interactions entre le chitosan et la mucine, composant le mucus, qui ralentit le transit dans l'intestin. Rappelons que la N-acétylglucosamine est elle-même anti-inflammatoire, comme on l'a vu plus haut. Elle est synthétisée à partir du glucose et est incorporée dans les glycoprotéines et les glucosaminoglycanes. Elle a été administrée chez l'humain par voie orale, intraveineuse et intramusculaire pour des études pharmacocinétiques. Il s'est avéré qu'elle pouvait diffuser rapidement dans la plupart des tissus et des organes pour s'accumuler dans les tissus et les os.

Des microsphères préparées à partir de chitosan réticulé et enrobées d'une couche de lipides (dipalmitoyl-phosphatidylcholine) ou de polysaccharides anioniques (carboxyméthylchitine) ont été utilisées pour libérer une émulsion de 5-fluorouracil (5-FU)⁽⁴⁵⁾. Les résultats de l'étude de libération du médicament dans une solution saline à 37°C montrent que la couche de lipides, et dans une moindre mesure, celle de polysaccharides, retardent la libération du 5-FU.

On connaît l'intérêt des nanoparticules hydrophiles dans l'administration de molécules thérapeutiques. Calvo *et al* proposent une nouvelle méthode de préparation de nanoparticules par gélification à partir de chitosan et de poly(oxyde d'éthylène)⁽⁴⁶⁾. Un test de libération d'albumine sérique a montré une bonne encapsulation de protéines et une libération continue sur une semaine.

La thérapie génique est un domaine en pleine expansion depuis quelques années. Là encore, la matrice d'enrobage de l'ADN est un élément clé pour l'obtention d'un système efficace. De nombreux systèmes non-viraux ont été proposés comme solution alternative aux vecteurs d'origine virale. Ces derniers sont en effet peu sûrs en ce qui concerne leur potentiel immunogène et leur stabilité, et ils sont de surcroît disponibles en trop faible quantité. Divers complexes lipidiques, protéiques ou polymères ont été testés pour diverses approches : certains systèmes dirigent la molécule d'ADN vers un récepteur membranaire en surface de la cellule. D'autres la font pénétrer dans la cellule et la dirigent vers le cytoplasme et sa chaîne enzymatique, ou vers le noyau. L'ADN étant chargée négativement, le chitosan semble être un bon candidat pour former avec elle un

complexe stable par interactions ioniques. Des études rapportent de bons résultats comme transporteur d'ADN via reconnaissance par un récepteur membranaire et endocytose. Le chitosan a également montré une faible cytotoxicité⁽¹⁷⁾.

Une autre étude rapporte les résultats d'un couplage entre un chitosan modifié lié à l'acide désoxycholique, donc rendu plus hydrophobe, et un plasmide⁽¹⁶⁾. Ce complexe forme des agrégats qui assurent une libération contrôlée du plasmide et une meilleure transfection des cellules hôtes par rapport à l'injection d'ADN seul. L'intérêt d'utiliser le chitosan dans ce cas réside principalement dans sa biodégradabilité et sa faible cytotoxicité.

1.2.3.3. Cosmétiques

Il est reconnu que le chitosan a des propriétés fongicides et fongistatiques. De plus, le chitosan est le seul polymère à devenir solide ou à augmenter en viscosité quand il est neutralisé en milieu acide. Il est utilisé comme adjuvant pour des crèmes, des lotions, et dans certains vernis à ongles⁽¹⁴⁾.

1.2.3.4. Agroalimentaire

La N-acétylglucosamine que l'on retrouve dans le lait d'origine humaine aide à la croissance des bactéries bifidus qui, d'une part, inhibent la croissance d'autres bactéries, et d'autre part synthétisent la lactase dont l'enfant a besoin pour métaboliser le lactose. Le lait de vache contient peu de N-acétylglucosamine, ce qui explique les indigestions rencontrées chez certains enfant nourris au lait de vache. Cette intolérance au lactose se retrouve également chez certaines personnes âgées. Des études chez l'animal ont montré qu'un supplément en chitine ou un de ses dérivés dans le petit lait utilisé pouvait améliorer la flore intestinale et permettre un gain de poids en améliorant la digestion⁽³⁴⁾.

Le chitosan a également été proposé comme supplément diététique dans les régimes amincissants⁽³⁴⁾. Il se lie aux graisses dans l'estomac avant qu'elles soient

absorbées au niveau intestinal. L'organisme ne peut absorber les complexes ainsi formés à cause de leur poids moléculaire trop important. Ils sont donc éliminés plus facilement et ils empêchent le métabolisme de ces graisses. L'intérêt du chitosan dans cette application réside dans le fait qu'il est chargé positivement et peut ainsi se lier aux acides biliaires ainsi qu'aux lipides chargés négativement.

1.2.3.5. Environnement

De par sa nature cationique, le chitosan peut se lier à de nombreux types de molécules chargées négativement. Il peut par exemple se lier à des protéines, ou chélater des ions métalliques. Il est ainsi utilisé dans le domaine environnemental pour purifier et pour assainir les eaux usées. On l'utilise également comme fertilisant ou comme additif pour l'alimentation animale⁽⁵¹⁾.

1.3. Approche expérimentale

1.3.1. Problématique

Bio Syntech Canada Inc a développé une nouvelle méthode brevetée de préparation de gel à base de chitosan. Dans le cadre d'études précliniques, il était intéressant de connaître le comportement du gel ainsi que la réaction d'un système hôte face à son introduction en milieu biologique. C'est pourquoi deux composés ont été choisis en fonction des données précédemment obtenues concernant leur comportement chimique à la gelation^(50,51), et étudiés *in vivo* et *in vitro*.

1.3.2. Tests et design expérimental

Connaissant les propriétés du chitosan vis-à-vis de souches cellulaires telles que les macrophages, il a semblé intéressant d'étudier *in vitro* le comportement de ce type cellulaire mis en contact avec les produits sélectionnés. Mais afin de tenir compte de la complexité de l'environnement biologique que constitue un organisme vivant, nous avons choisi le rat comme modèle *in vivo* pour évaluer la réponse obtenue lors de l'implantation de ce matériel *in situ*. C'est pourquoi les expériences décrites dans ce mémoire se partagent en deux parties distinctes mais dont les résultats sont complémentaires. Une partie concerne les données *in vitro* obtenues par culture de macrophages de souris en surface de gels synthétisés à Bio Syntech, alors qu'une autre partie concerne l'introduction à long terme de ces mêmes matériaux chez le rat, afin d'étudier les réponses aiguës et chroniques développées *in situ*. Il est important de rappeler que ces deux espèces animales, quoique proches, pourraient présenter des variations dans les réponses obtenues.

Chapitre 2 : Produits et Méthodes

2.1. Les solutions de chitosan

Le chitosan utilisé pour l'ensemble des expériences qui seront décrites ultérieurement proviennent de chez *Maypro*. Nous avons utilisé trois chitosans de degrés de désacétylation (dda) différents : un chitosan désacétylé à 95% (95DA, lot Maypro-99-ASCQ-0140), un chitosan désacétylé à 89% (89DA, lot Maypro-99-ASCQ-0551), et chitosan désacétylé à 91.7% (91.7DA, BST-gel, lot PCCH00007). Le matériau brut se présente sous forme de poudre. Elles ont été dissoutes pendant 24 heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 0.1M sous agitation. Une concentration de 3% (w/v) a été requise pour les gels utilisés pour des tests *in vivo* pour des raisons de maintien mécanique lors de l'implantation chirurgicale. Pour les tests de cytotoxicité *in vitro*, les gels préparés avaient une concentration de 2% (w/v).

2.2. Les solutions de β -glycérophosphate (β GP)

Des solutions aqueuses de β -glycérophosphate disodique ont été préparées dans de l'eau déionisée (280mM pour le chitosan désacétylé à 95%, et 276mM pour le chitosan désacétylé à 89%, la quantité de β GP étant fonction du dda). Le β GP provient de chez SIGMA, il est certifié par le fournisseur comme étant non cytotoxique pour les cultures de cellules (N. de catalogue G9891).

2.3. Stérilisation

Les solutions de chitosan ont été autoclavées à 120°C et 100kPa pendant 20 minutes, puis disposées à 4°C ensuite jusqu'à refroidissement suffisant. Le mélange des deux solutions, chitosan et β GP, doit en effet se faire à 4°C pour éviter toute précipitation ^(50,51). En ce qui concerne les solutions de β GP, une filtration sur filtre de

0.2µm fut utilisée. Les deux solutions de βGP de concentrations différentes furent ensuite mises à 4°C.

2.4. Préparation des gels

Les solutions de chitosan et de βGP furent mises à 4°C dans de l'eau glacée, avant que les solutions de βGP ne soient ajoutées goutte-à-goutte, sous agitation constante, à leur solution de chitosan respective. Une fois les mélanges homogénéisés, les solutions furent, soit dispensées dans des seringues stériles de 1ml de chez Becton-Dickinson et mises à 4°C avant injection, ou laissées à gélifier à 37°C pendant 48 heures dans des pétris stériles. Dans les solutions gélifiées, des disques de 6mm de diamètre et de 1mm d'épaisseur furent découpés et soit conservés à 4°C avant l'implantation chirurgicale, soit lyophilisés et conservés à 4°C.

2.5. Expérimentation *in vivo*

Toutes les expérimentations *in vivo* furent effectuées chez des rats Sprague-Dawley adultes, mâles, pesant entre 250 et 300 grammes. Un mélange d'hypnorm[®]/midazolam[®]/eau déionisée fut utilisé pour l'anesthésie générale (50µg/100g de poids corporel). Le dos des rats fut préalablement rasé et désinfecté en utilisant un mélange d'éthanol 70% et de Provioline, dispensé sur des compresses stériles. Les injections et les implantations ont été faites dans le muscle médial glutéal (medius gluteus), au niveau fessier. Chaque expérience fut répétée en triplicata.

Les injections intramusculaires ont été faites avec des aiguilles 22G de chez Becton-Dickinson. Une solution saline stérile fut injectée pour les contrôles.

Pour les gels sous forme solide (disques gélifiés et lyophilisés), une implantation chirurgicale sous conditions aseptiques fut effectuée. Les plaies ont été refermées avec du fil chirurgical stérile Dermalon 3.0. Pour les contrôles, une incision chirurgicale fut pratiquée et refermée sans implantation de matériel.

Aux jours 1,3,7,15,30,60,80, et 120, les rats furent sacrifiés par asphyxie au CO₂, et les implants furent collectés, fixés dans une solution de Formalin 10% (formaldéhyde, méthanol, eau), puis traités par une coloration HPS (Hématoxiline, phloxine, safran) pour analyse histopathologique. Les résultats furent revus par un histopathologiste indépendant. Les plaques histologiques furent analysées sur un microscope Nikon Elipse TE300, doté d'un système d'analyse d'images Metaview et d'une caméra Coolsnap de RS Photometrics.

2.6. Expérimentation *in vitro*

2.6.1. Souches cellulaires et culture de cellules

Toutes les expériences *in vitro* ont été faites sur des macrophages J774A.1 de souris balb/c, de chez ATCC (Numéro de catalogue : TIB-67). Elles ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640, supplémenté à 2mM en L-glutamine, et à 1mM en pyruvate de sodium. Une concentration volumique de 10% en FBS (*Fetal Bovine Serum*) a été utilisée pour chaque culture. Les produits utilisés ainsi que leur provenance sont listés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Liste des produits et de leur provenance.

Produit	Provenance	No de catalogue
RPMI	GibcoBRL	11875-093
FBS	GibcoBRL	10437-028
L-glutamine	GibcoBRL	25030-081
Pyruvate de sodium	GibcoBRL	11360-070
PBS	GibcoBRL	10010-023
Bleu de trypan	GibcoBRL	15250-061
Giemsa	Sigma	089H4376

Le PBS utilisé ne contient ni CaCl_2 ni MgCl_2 .

2.6.2. Test de libération de βGP

2.6.2.1. But

Nous avons émis l'hypothèse que lors des implantations de matériel *in vivo*, le βGP est relargué en grande partie. Nous appuyons cette hypothèse sur le fait que le milieu biologique étant dépourvu de βGP , on peut supposer qu'une grande partie est libérée par diffusion simple. Enfin, le βGP utilisé est certifié par le fournisseur, SIGMA, comme étant non cytotoxique en culture de cellules. Ceci nous a amené à porter notre attention sur le chitosan lui-même lors des tests *in vitro*. C'est pourquoi nous avons établi une procédure de rinçage systématique des gels avant d'initier la culture de cellules sur la matrice de chitosan. Nous avons donc procédé à un test de libération du βGP pour connaître les meilleures conditions de rinçage afin d'éliminer la plus grande quantité de βGP .

2.6.2.2. Manipulations

Un système de chambres de culture en polypropylène, intégrées sur des plaques histologiques en plastique Permanox[®], de chez Nalge Nunc International (Naperville, IL) a été utilisé pour ce test. Ce système est connu sous le nom de "Lab-Tek Chamber Slide System[™]". Chaque plaque comporte 8 puits distincts, ayant chacun une surface de 70mm^2 . Pour des raisons de disponibilité de matériel, seul un gel désacétylé à 89% est préparé selon la procédure décrite plus haut. Dans chaque puit, on dispense $300\mu\text{l}$ de chitosan. Les plaques sont laissées à 37°C pendant 48 heures pour que le gel durcisse. Une fois le gel prêt, 1ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*, 7.4) fut ajouté à chaque puit au temps initial, et remplacé par du PBS frais toutes les heures pendant les 4 premières heures. Puis deux groupes sont formés. Dans le premier, du PBS est ajouté pour une

cinquième heure supplémentaire, tandis que dans le deuxième groupe, du PBS est ajouté pour une durée de 48 heures. Après 48 heures, les deux groupes sont repris pour un dernier rinçage de 1 heure avec 1ml de PBS.

À chaque temps, 800µl de PBS recueilli est conservé, et un standard interne (Na_2HPO_4) est ajouté. La concentration de βGP utilisée lors de la synthèse d'un gel de chitosan désacétylé à 89% est de 276mM. Ceci constitue la concentration maximale que l'on peut attendre une fois l'ensemble des opérations de préparation effectuées. Une solution stock de Na_2HPO_4 de concentration 2.76M est préparée, et 100µl de cette solution sont ajoutés à chaque échantillon afin d'obtenir une concentration finale de 276mM dans le 1ml final de chaque échantillon. Cent µl de D_2O sont enfin ajoutés comme solvant de référence pour le spectromètre RMN sur lequel l'analyse a été effectuée, à savoir un Varian Unity 500MHz. L'ensemble des spectres RMN du phosphore contenu dans le βGP sont montrés dans le chapitre suivant. Puisque chaque puit a été lavé avec du PBS, solution contenant déjà du phosphate, il faut retrancher à chaque valeur obtenue la quantité de phosphate provenant du βGP . D'après le fournisseur, le PBS contient 0.144g/l de KH_2PO_4 (Masse molaire de 136g/mol), et 0.795g/l de Na_2HPO_4 (masse molaire de 268g/mol). On a donc $1.06 \cdot 10^{-3}$ mol/l de KH_2PO_4 et $2.96 \cdot 10^{-3}$ mol/l de Na_2HPO_4 , ce qui fait un total de $4.12 \cdot 10^{-3}$ mol/l en phosphate. Sachant que 1ml de PBS sont dispensés à chaque lavage, on retranche $4.12 \cdot 10^{-6}$ moles de phosphate aux valeurs obtenus par RMN.

2.6.3. Test d'adhésion cellulaire

L'adhésion des macrophages J774A.1 a été évaluée, afin de connaître les interactions entre le gel et ce type cellulaire, dont le rôle central dans les phénomènes d'inflammation et d'immunité a été montré dans la revue de littérature.

Les cultures cellulaires faites dans le cadre du test d'adhésion cellulaire ont été pratiquées sur le même système que celui utilisé pour le test de libération du βGP ("Lab-Tek Chamber Slide System[®]"). Les plaques utilisées contenaient 4 puits distincts les uns

des autres. Dans chaque plaque, un même échantillon est testé en triplicat, et un contrôle est évalué en parallèle, avec la même concentration cellulaire. Pour ce dernier, la culture cellulaire est effectuée directement sur la plaque de verre. Chaque puit a une surface de 180mm^2 .

Un gel 95%DA et un gel 91.7%DA ont été évalués en parallèle. Ils furent préparés tel que décrit plus haut. Une fois le mélange chitosan/solution de β GP homogénéisé, 400 μ l de chaque gel furent dispensés dans 3 puits de chaque plaque, le quatrième étant réservé au contrôle. La procédure de rinçage des gels est la suivante : 1ml de PBS stérile était dispensé dans chaque puit contenant du gel. Il fut renouvelé par 1ml de PBS frais toutes les heures pendant les 4 premières heures, puis laissé 48 heures à 37°C . Les puits furent alors vidés avant d'ensemencer les cellules.

Trois concentrations différentes de cellules furent ensemencées sur les gels : 2.10^3 , 2.10^4 , et 2.10^5 cellules/ml. La surface étant de 180mm^2 , ces concentrations correspondent respectivement à 11, 111, et 1111 cellules/ mm^2 . Chaque plaque représente une même concentration de cellules, dispensées sur un des deux types de gels, à un temps de culture donné, ceci afin d'éviter les biais dus à un éventuel contact entre des conditions de culture différentes.

Les cellules sont diluées dans du milieu de culture RPMI 1640 (10% FBS) pour obtenir trois solutions distinctes, de concentration respective 2.10^3 , 2.10^4 , et 2.10^5 cellules/ml. Un ml de chaque solution est inséminé aux puits correspondants. Les plaques sont ensuite mises en culture à 37°C (5% de CO_2), pendant 1, 2, 3, 4, 8, 24, ou 48 heures. À chaque temps, le milieu de culture des plaques correspondantes est enlevé, puis les cellules sont fixées et colorées selon le protocole suivant :

Fixation		Coloration	Lavage (x2)
Methanol/Eau déionisée	Methanol pur	Giemsa/Eau déionisée (1:15)	Eau déionisée
10 minutes	10 minutes	10 minutes	10 minutes

Les plaques sont ensuite séchées à l'air libre pendant 1h et observées au microscope pour comptage cellulaire. Une surface de référence rectangulaire de 785.7µm par 550µm est utilisée pour le comptage. La surface est donc de 0,4321 mm². Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mm².

Une analyse statistique fut menée avec le logiciel Statview v.5.0.1 (SAS, Cary, NC, USA). Une analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test de schéffé sera fait sur chaque arrangement de valeurs afin de déterminer les différences significatives entre les variables 'temps', 'concentration', et 'gel'. Le test de Schéffé sera appliqué aux valeurs trouvées différentes suite à l'ANOVA.

Chapitre 3 : Résultats

3.1. Biocompatibilité *in vivo*

3.1.1. Réaction aiguë

Les implants récoltés après sacrifice sont restés au site d'implantation, aucune migration de matériel hors du groupe musculaire sélectionné n'a été observée. Ceci est valable autant pour les gels injectés sous forme de liquide visqueux, que pour les gels solides ayant subi une première phase de gélation *in vitro*. Aucune nécrose du muscle environnant n'a été observée macroscopiquement. L'observation histologique des implants a montré que les gels subissaient une érosion progressive en surface (voir photo 1), principalement due à une phagocytose par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PMNs) présents quelques heures après l'implantation (voir photo 2 et 3). On peut noter que d'une façon générale, les gels désacétylés à 89% (89DA) ont induit une réponse relativement plus forte que les gels désacétylés à 95%, et dont le délai d'apparition fut plus court. Ainsi, et ceci concorde avec les données généralement admises dans la littérature, le gel ayant le degré de déacétylation le plus faible a entraîné une réponse inflammatoire aiguë plus importante^(34,26,27,52).

Les PMNs ainsi que les macrophages ont pu être observés dès le premier jour après l'implantation pour les 89DA injectés. La réaction inflammatoire aiguë observée pour les 89DA injectés s'accompagnait d'une nécrose des myocytes environnants dans les premiers stades, avant 7 jours (voir photo 4). Il s'agit peut être d'une conséquence du processus de gélation *in situ*, qui implique une dispersion du gel encore à l'état liquide entre les faisceaux musculaires. Il s'en suit une isolation de certaines cellules qui meurent peut-être par manque d'apport en nutriments et en oxygène. Il n'est pas possible de conclure à un effet toxique du gel sur ce point puisque l'implantation de gels à l'état compact n'a jamais été associé à ce phénomène. De plus, ce dernier s'est étendu sur les

premiers jours et n'a plus été observé par la suite. Ceci pourrait confirmer l'idée qu'il s'agit là d'un phénomène ponctuel annexe, non lié aux propriétés du chitosan injecté lui-même, mais plutôt du aux phénomènes physiologiques accompagnant la gélification *in situ*.

Les leucocytes présents se retrouvent vite dans l'implant lui-même. La proportion de cellules ayant pénétré les gels va grandissante, même au delà de la phase aiguë de la réaction. L'érosion de surface des gels peut être attribuée au moins en partie à la phagocytose de matériel par les macrophages. (voir photo 2). Quelques fibrocytes étaient présents dès la première semaine. On verra qu'ils proliféreront rapidement, pour finalement se différencier en fibroblastes.

A l'opposé, les implants gélifiés et lyophilisés n'ont subi aucune dispersion de matériel. Une inhibition de la pénétration des leucocytes dans les implants gélifiés a été observée, par rapport aux gels injectés, bien que ces populations cellulaires furent présentes dès la première semaine. Quelques cellules sont présentes lors de la première semaine, sans qu'aucun élément ne nous permette de conclure quant à un éventuel effet chimioattracteur du chitosan. Après trois jours, de nombreux débris cellulaires sont présents, ressemblant fort à des restes de PMNs. La demi-vie de ce type cellulaire n'est en effet que de quelques heures. Quelques rares macrophages ont pénétré les gels à ce stade. Peu de matériel phagocyté a pu être observé avant 7 jours. Les leucocytes restent concentrés dans la partie périphérique externe et interne des implants (voir photo 5).

Les gels lyophilisés ont tout d'abord absorbé de l'eau et gonflé pour retrouver un aspect macroscopique proche des disques de chitosan gélifiés. C'est sans doute ce processus qui a entraîné l'inhibition d'attachement cellulaire observé pendant la première semaine. En effet, jusqu'à 7 jours, très peu de leucocytes purent être décelés autour des implants. La structure microscopique des implants lyophilisés est singulièrement différente des autres, dans le sens qu'elle est moins compacte, les disques sont moins pleins. Peu de cellules pourront être observées dans les parties compactes du gel, elles seront plutôt concentrées dans ces espaces vides de matériel. Enfin, peu de matériel phagocyté a pu être observé jusqu'à 7 jours.

3.1.2. Réponse chronique

Au delà d'une semaine, une matrice capsulaire commence à enrober les biomatériaux, les isolant ainsi du contact direct avec les tissus musculaires. Son apparition est plus précoce en ce qui concerne les 89DA, principalement sous forme injectée. Les fibrocytes présents sur le site se sont différenciés en fibroblastes, dont l'aspect morphologique est différent. La production de fibres de collagène apparaît clairement autour des implants. Ces fibres sont produites de façon désordonnée dans un premier temps, elles sont non orientées et d'aspect plus pâle que celles qui seront observées à plus long terme (voir photo 6). Des fibroblastes ayant pénétré les implants produisent un réseau de fibres de collagène à l'intérieur des implants qui se trouvent ainsi fragmentés et plus facilement dégradables. Cette caractéristique se retrouve principalement pour les gels injectés, dont la pénétration cellulaire fut plus généralisée.

Des lymphocytes et, plus tard, des plasmocytes, furent présents dans la capsule. L'importance du nombre de lymphocytes observées est à nuancer par le fait que l'espèce animale utilisée pour les expériences *in vivo*, à savoir le rat, est une espèce à forte prédominance des lymphocytes⁽⁶²⁾. Ce type cellulaire se retrouve ainsi dans pratiquement toute réaction de l'hôte contre l'introduction d'un corps étranger⁽⁶³⁾. Ainsi, rien ne nous permet, sans de plus amples recherches, de conclure dans un sens ou dans l'autre en ce qui concerne une éventuelle immunité humorale et une production d'anticorps dirigés contre le chitosan. Au delà de 60 jours, quelques cellules géantes sont présentes (voir photo 7).

Les macrophages se sont différenciés en cellules épithélioïdes pour constituer un granulum dense, concentré autour des implants. Cette évolution de la réaction vers une réaction chronique granulomateuse est généralisée à tous les types de polymères

implantés ici. Il semble cependant que l'épaisseur du granulum soit plus importante en ce qui concerne les 89DA, principalement sous forme injectée.

La capsule contient également des vaisseaux sanguins et lymphatiques néoformés, qui se multiplient dans le temps, pour être finalement présents de façon généralisée. Ils approvisionnent le site en nutriments, en oxygène et en cellules, accélérant ainsi les processus de cicatrisation et de résorption. Une capsule plus épaisse fut observée a long terme pour les gels injectés. Ces derniers ont subi une plus longue et plus intense érosion périphérique. Ceci explique sans doute que certains implants aient disparu à 120 jours (photo 8). En revanche, l'érosion des capsules gélifiées est plus limitée. Ils sont toujours présents à 120 jours, entourés d'une fine capsule mature et vascularisée. Les gels lyophilisés, quant à eux, présentent une érosion plus légère. La capsule les entourant est également plus fine, et des paquets de collagène vascularisé se retrouvent dans les espaces internes vides des implants (photo 9).

Il semble donc que, non seulement le degré de déacétylation du gel, mais également la forme sous laquelle il est implanté conditionne l'intensité et les caractéristiques de la réaction inflammatoire. Une formulation injectable semble ainsi plus adéquate pour une implantation à court terme, avec une dégradation accélérée. En revanche, une formulation d'éponge lyophilisée semble plus appropriée pour une application à long terme, pour un système de libération sur une grande plage de temps, ou une matrice de réparation osseuse ou cartilagineuse par exemple.

Le tableau 3.1 résume les observations décrites en détail plus haut. Pour des raisons de simplification, nous ne présentons que trois temps représentatifs des événements commentés. Les gels désignés par 95I, 95G, 95L représentent le gel déacétylé à 95% sous forme injectée, gélifiée, et lyophilisée, respectivement. De même, les gels désignés par 89I, 89G, 89L représentent le gel déacétylé à 89% sous forme injectée, gélifiée, et lyophilisée, respectivement. Les réponses sont classées selon

l'échelle d'évaluation suivante : de 0 (néant) jusqu'à 4 (sévère). Les photos 10 à 15 montrent la structure des gels et la capsule les entourant selon la forme physique sous laquelle ils furent implantés.

Tableau 3.1. Réaction de l'hôte vis à vis des différents gels.

Gel	Jour	Leucocytes	Capsule	Myosite	Erosion
95I	3	1	0	2	0
	15	2	1	0	1
	80	3	3	0	3
89I	3	1	0	2	0
	15	3	2	0	1
	80	4	3	0	4
95G	3	1	0	0	0
	15	2	1	0	1
	80	2	3	0	2
89G	3	1	0	0	0
	15	2	2	0	1
	80	3	3	0	3
95L	3	1	0	0	0
	15	2	1	0	1
	80	2	2	0	2
89L	3	1	0	0	0
	15	2	1	0	1
	80	3	2	0	3

Légende des photos

C : capsule

G : gel

CG : cellule géante

CM : cellules musculaires

M : myosite

P : phagocytes

V : vaisseaux sanguins

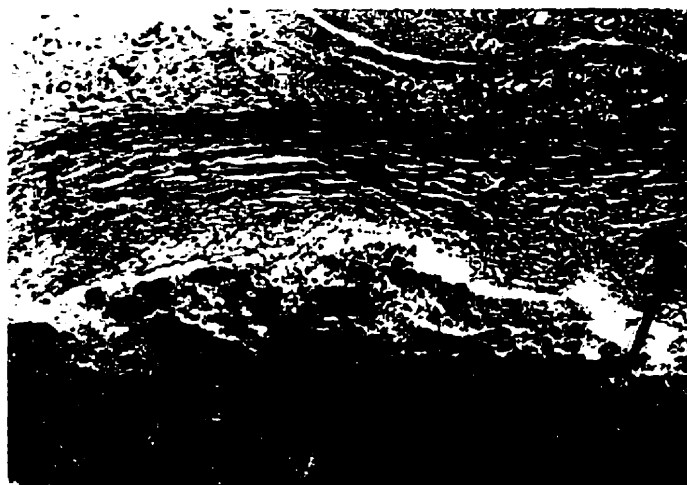


Photo 1 : Érosion d'un 89DA injecté - Jour 60 (x20)



Photo 2 : Neutrophiles et macrophages - Jour 1 - 95DA lyophilisé (x60).

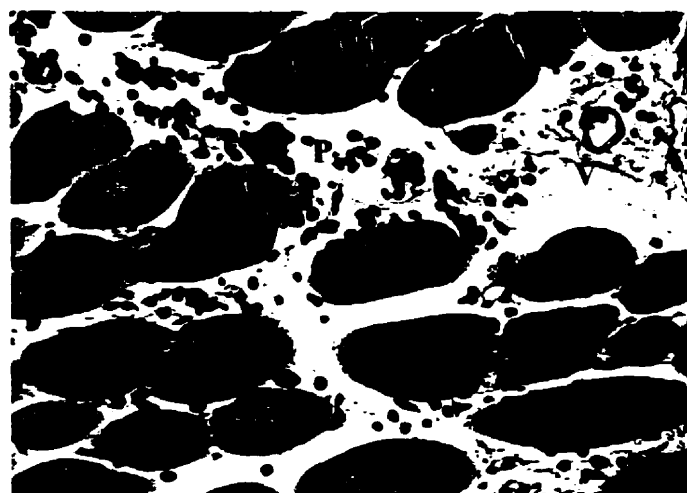


Photo 3 : phagocytose - 89DA injecté - Jour 1 (x40).



Photo 4 : myosite à 7 jours - 89DA injecté (x20).



Photo 5 : Cellules au contact du gel 95DA pré-gelé - Jour 3 (x20).

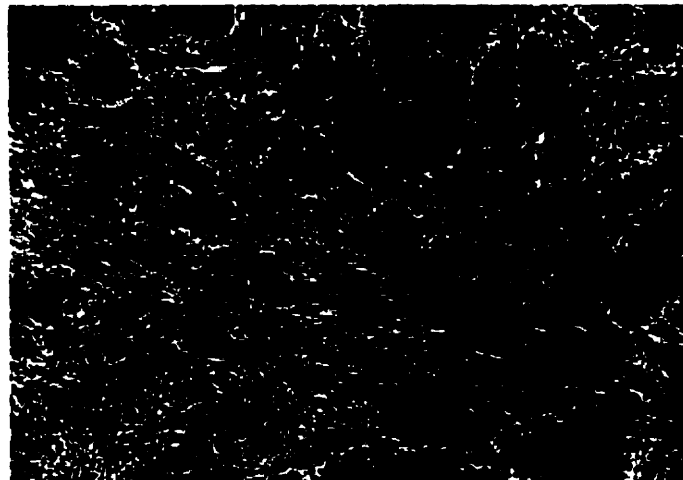


Photo 6 : Organisation de la capsule – Jour 15 – 95DA pré-gelé (x20)

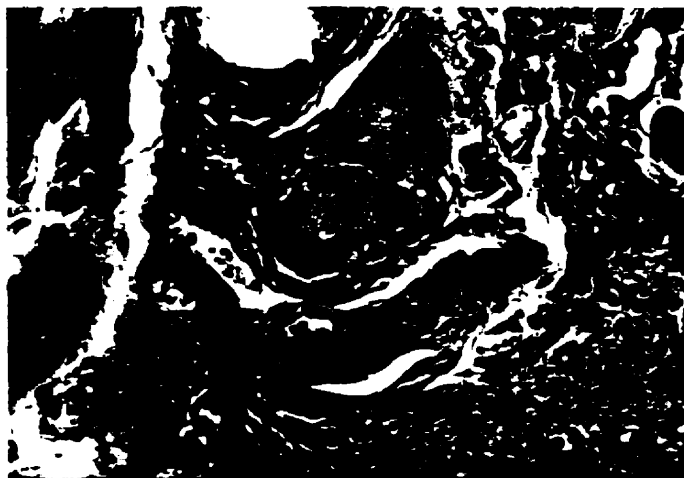


Photo 7: Cellules géantes – 95DA lyophilisé – Jour 120 (x60)

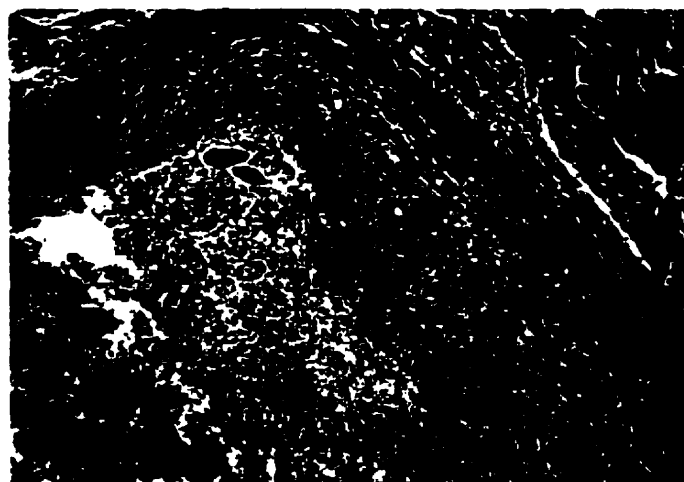


Photo 8 : Implant restant à 120 jours – 89DA injecté (x10).

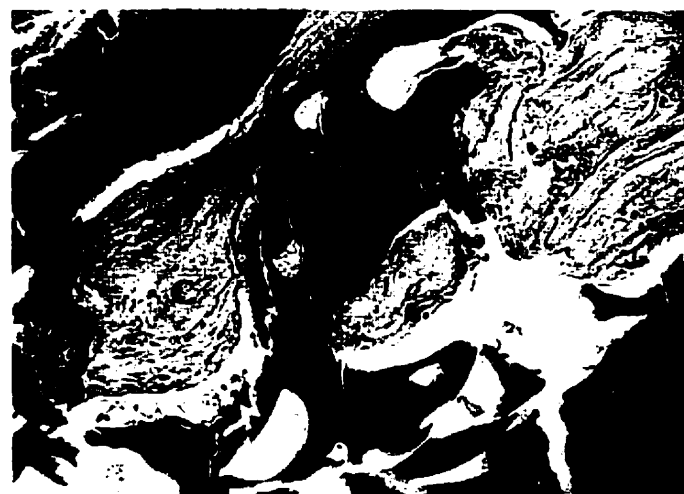


Photo 9 : Travées de collagène dans les espaces libres – 95DA lyophilisé - Jour 60 (x20).

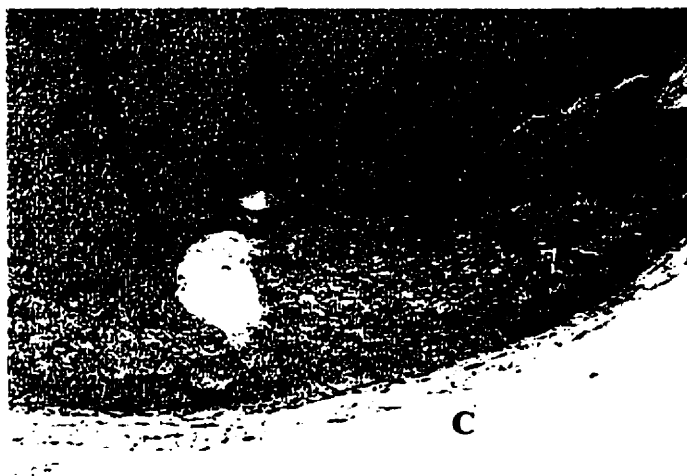


photo 10 : Structure d'un gel injecté ayant gelé *in situ* (95DA) – Jour 3 (x10)

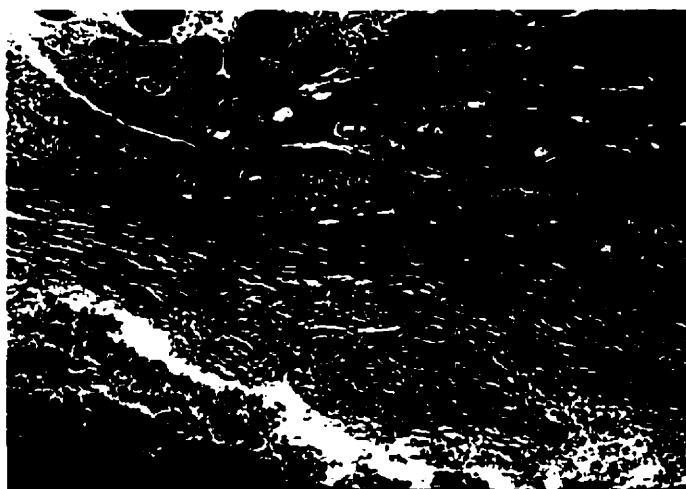


Photo 11 : capsule d'un 89DA injecté – Jour 120 (x20)

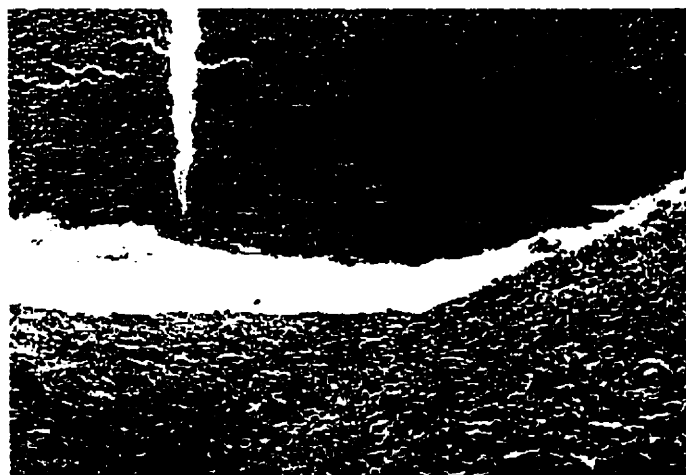


Photo 12 : Granulum autour du 95DA pré-gelé – Jour 80 (x20)



Photo 13: capsule autour d'un 89DA pré-gelé - Jour 15 (x10)

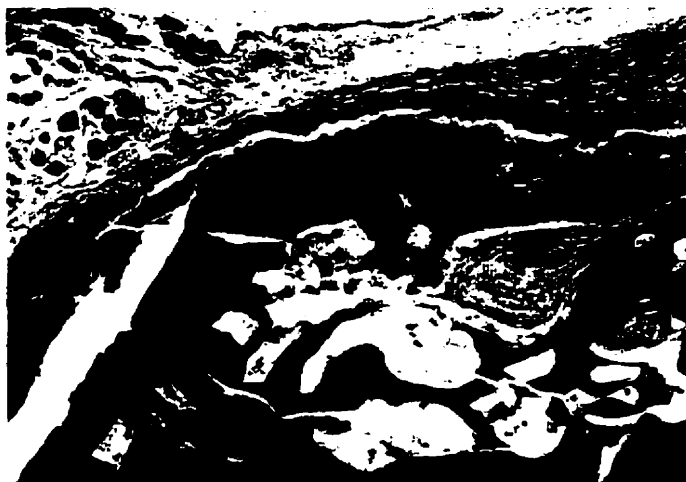


Photo 14: 95DA lyophilisé - Jour 60 (x10)



Photo 15 : 89DA lyophilisé - Jour 120 (x10)

3.2. Expériences *in vitro*

3.2.1. Test de libération du β GP

À chaque temps, le pourcentage obtenu est relié au pic de Na_2HPO_4 correspondant au 100%, c'est à dire à 276mM. On obtient ainsi le nombre de moles dans chaque échantillon de 1ml. Sachant que chaque puit contient 300 μ l de gel, le nombre de moles initial de β GP dans chaque puit est de :

$$276.10^{-3} * 300.10^{-6} = \underline{82.8.10^{-6} \text{ moles}}$$

À chaque nombre de moles de phosphate calculée, on retranche $4.12.10^{-6}$ moles pour tenir compte du phosphate déjà présent dans le PBS.

Ainsi, on a : % libéré par heure = $((\% \text{ relatif} * 276.10^{-3}.1.10^{-3}) - 4.12.10^{-6}) / 82.8.10^{-3}$

Le rapport entre le nombre de moles de β GP libéré dans le PBS à chaque temps et le nombre de moles initial nous donne le pourcentage de β GP libéré à chaque temps. L'ensemble de ces données sont compilées dans le tableau 3.2. Le pourcentage relatif représente le rapport entre l'intensité du pic de phosphore à chaque temps sur l'intensité du pic du standard interne (Na_2HPO_4). Pour des raisons logistiques de données, on ne présente que l'expérience menée à 6 heures.

Tableau 3.2. Résultats du test de libération du β GP.

Temps	pourcentage relatif	Pourcentage libéré par heure	Pourcentage libéré au total
c	13.53	40.1	40.1
2h	5.71	14	54.1
3h	4.66	10.5	64.6
4h	2.35	2.8	67.4
5h	1.47	0	67.4
6h	1.6	0.3	67.7

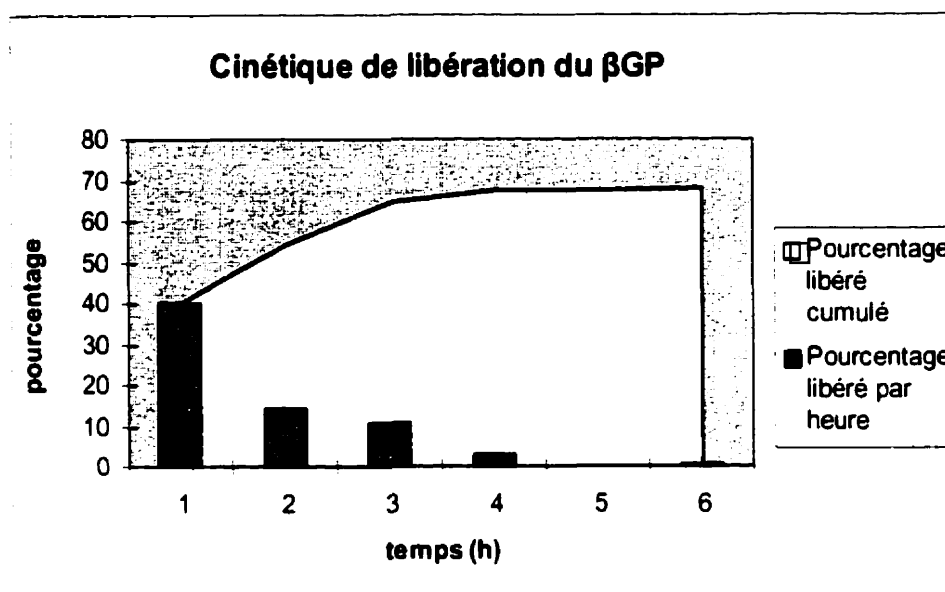


Figure 3.1. Résultats du test de libération du β GP.

On constate que le β GP a été libéré en grande partie. Par conséquent, on peut supposer que la surface des gels étudiés lors des tests d'adhésion cellulaire n'est pratiquement composée que de chitosan. Les résultats obtenus lors de ce test devront donc être rapportés au comportement des cellules vis à vis du chitosan lui-même.

Cette expérience présente une tendance. En effet, par manque de matériel et pour des raisons de coût, une seule expérience a été menée, et sur un seul des deux gels.

3.2.2. Test d'adhésion cellulaire

Les résultats du test d'adhésion sont présentés dans les figures 3.2 et 3.3. Remarquons tout d'abord qu'en ce qui concerne les deux gels à 24 heures et 48 heures, pour une concentration cellulaire de $1111 \text{ cellules/mm}^2$, aucun dénombrement de cellules n'a pu être fait. En effet, à 24h, on a enregistré une croissance cellulaire rendant difficile le dénombrement. Certaines cellules ont également changé de morphologie (voir photos). En revanche, à 48h, la mort cellulaire allait croissante, et comme la morphologie de certaines cellules était ambiguë, il était difficile de définir précisément leur état

(vivantes/apoptotiques/mortes). La mort cellulaire observée entre 24 et 48 heures est sans doute une conséquence de l'acidification du milieu de culture, mis en évidence par le changement de couleur du rouge de phénol utilisé dans le milieu comme indicateur coloré. Il serait intéressant d'étudier l'état d'activation des macrophages, et d'évaluer dans quelle mesure ils acidifient le milieu, par relargage de radicaux oxygénés par exemple. Ceci fera l'objet d'études ultérieures.

Une deuxième remarque concerne les contrôles : un seul puit a été utilisé pour chaque contrôle, on ne peut donc calculer d'écart type dans ce cas. Il sera de même impossible de calculer le *t* de student entre les paramètres 'échantillons' et 'contrôles'.

On constate une différence nette d'adhésion cellulaire entre chaque échantillon de concentration cellulaire donnée et le contrôle correspondant, bien qu'on ne puisse déterminer si cette différence est significative ou non. Ceci est surtout remarquable à 111 et 1111 cellules/mm² (voir figures 3.2 et 3.3). Les tableaux 3.3 et 3.4 présentent les valeurs exprimées dans les figures. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules/mm². ND : non déterminé pour les raisons de problèmes de comptage décrits plus haut. On a pu voir une croissance cellulaire jusqu'à 24 heures, après quoi, l'acidification du milieu a entraîné la mort de la plupart des cellules. Il serait intéressant de faire une culture de cellules à long terme, en remplaçant le milieu de culture par un milieu frais toutes les 24 heures, afin d'évaluer la cytotoxicité du chitosan vis à vis de cette souche cellulaire. Quoiqu'il en soit, cette étude met clairement en évidence que les macrophages J774A-1 adhèrent particulièrement bien aux chitosans évalués, et que les gels utilisés n'ont pas montré de cytotoxicité particulière, au moins jusqu'à 24h.

En ce qui concerne l'adhésion cellulaire, peu de différences sont à noter si l'on compare les deux gels. Néanmoins, le test de schéffé fait en comparant les deux gels à différents temps et aux différentes concentrations, montre une différence significative entre les deux gels à 11 cellules /mm² à 3h, 4h et 8h, à 111 cellules/mm² à 8h et 48h, et à 1111 cellules/mm² à 2h (voir tableau des valeurs en annexe). Nous n'avons pas noté

d'effet particulier de la concentration ensemencée sur l'adhésion cellulaire, que ce soit dans le sens d'une inhibition ou d'une activation.

Les figures 3.4 et 3.5 présentent les pourcentages d'adhésion cellulaire pour chaque temps. Les valeurs sont détaillées dans le tableau 3.5, dans lequel la partie supérieure concerne le gel désacétylé à 91.7%, et la partie inférieure le gel désacétylé à 95%. D'une manière générale, on constate que les échantillons présentent un pourcentage d'adhésion bien supérieur aux contrôles dans les premiers temps de l'expérience, puis les cellules meurent, possiblement dû à une acidification du milieu. Au contraire, les contrôles montrent une croissance dans les derniers temps. On peut supposer que les macrophages, en présence du chitosan, produisent des molécules entraînant la mort cellulaire, comme de l'oxyde nitrique. Il serait intéressant dans une expérience ultérieure de doser ce composé dans le milieu de culture tout au long de l'expérience.

Enfin, Le test de schéffé révèle quelques données intéressantes. En ce qui concerne le 91.7DA, à une concentration de 111 cellules/mm², on trouve une différence d'adhésion cellulaire significative entre les temps 1h/4h, 3h/4h, 4h/8h, et 4h/48h. Pour le 95DA, pour une concentration de 111 cellules/mm², le test ANOVA ne nous permet de faire le test de schéffé. L'ANOVA ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet du degré de désacétylation quelquesoit la concentration. Ceci montre que les macrophages J774A-1 adhèrent en surface du chitosan utilisé, et qu'ils prolifèrent rapidement après l'ensemencement. Nous n'avons pas pu déterminer le temps de dédoublement car nous avons arrêté la culture à 48 heures. Il pourrait être intéressant de cultiver les cellules à long terme en surface du chitosan, en remplaçant le milieu tous les jours ou tous les deux jours, afin de connaître le temps de dédoublement et d'évaluer le comportement à long terme des cellules. On a dit en effet qu'on ne pouvait déterminer avec certitude l'état des cellules à 24 et 48 heures pour une concentration de 1111 cellules/mm².

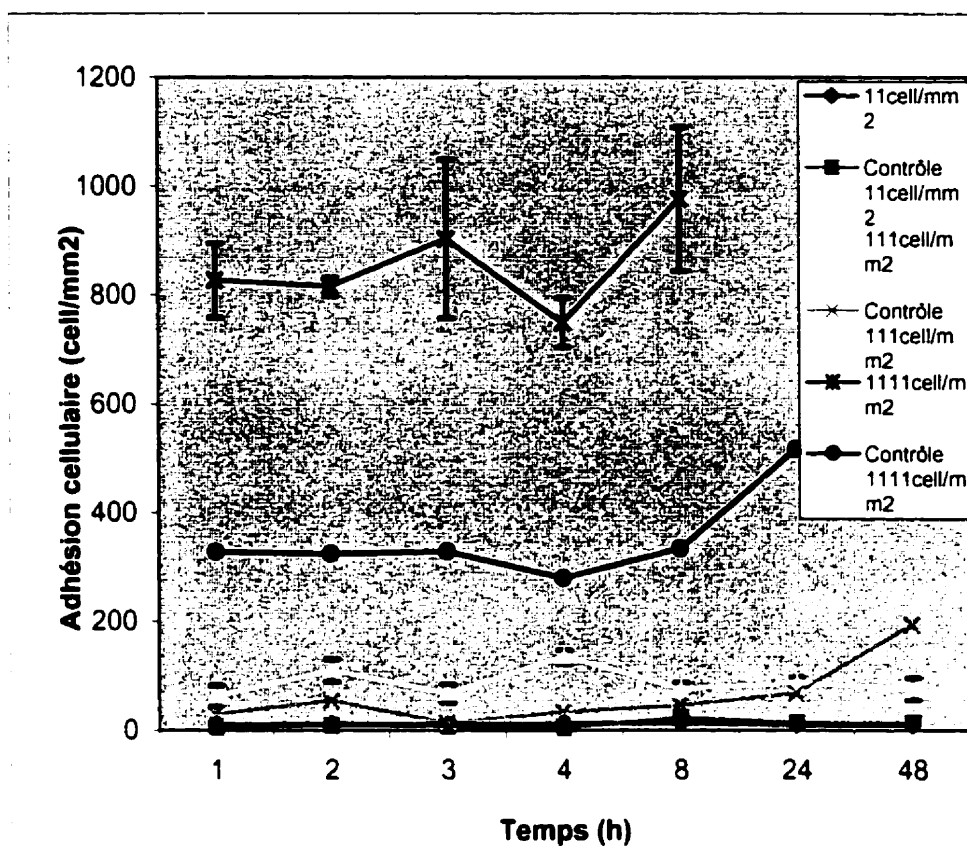


Figure 3.2. Résultat du test d'adhésion cellulaire - 91.7DA

Tableau 3.3. Résultat du test d'adhésion cellulaire – 91.7DA

Temps (h)	Écart- type 11		Contrôle 11	Écart- type 111		Contrôle 111	Écart- type 1111		Contrôle 1111
	(cell/ mm2)	cell/m m2	(cell/mm2)	(cell/ mm2)	cell/mm 2	(cell/mm2)	(cell/ mm2)	cell/m m2	(cell/mm2)
1	9,25	2,31	5,20	63,25	19,40	29,50	827,35	68,38	328,04
2	11,18	3,39	8,09	110,31	20,55	54,38	815,59	17,01	324,57
3	10,60	1,85	6,94	67,30	16,74	13,30	903,34	145,66	329,20
4	11,37	2,85	4,04	134,61	13,44	33,55	749,53	45,41	279,44
8	14,27	1,45	23,14	76,37	11,87	45,12	976,24	131,38	334,41
24	9,25	4,01	13,30	86,59	11,43	68,84	ND	ND	517,24
48	9,25	0,33	13,30	76,17	19,75	194,39	ND	ND	ND

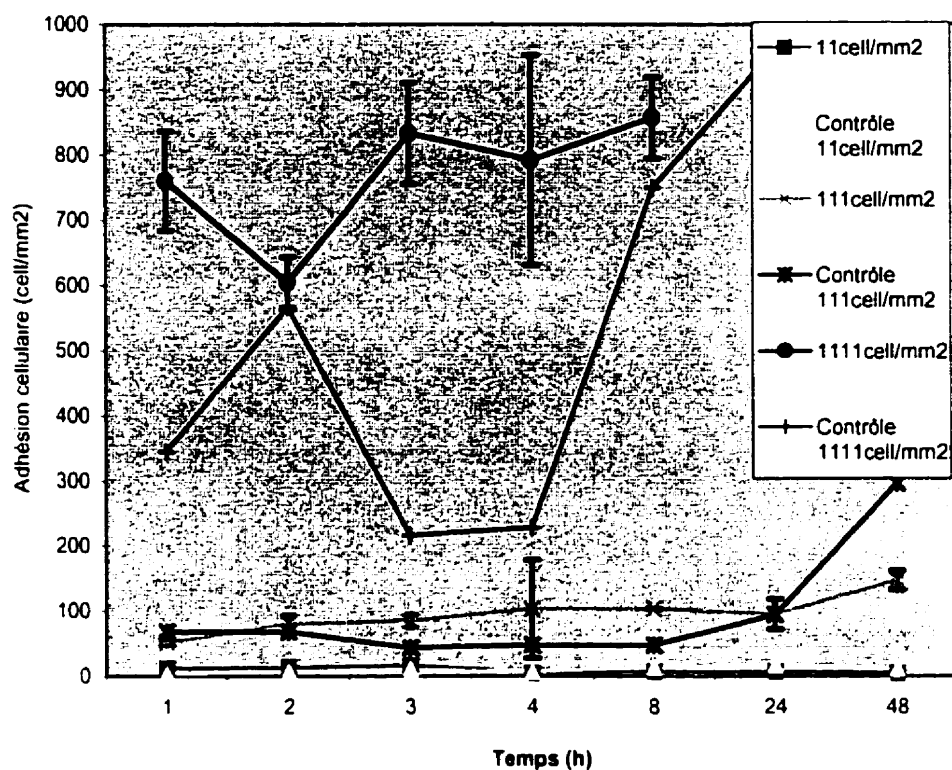


Figure 3.3. Résultat du test d'adhésion cellulaire – 95DA.

Tableau 3.4. Résultat du test d'adhésion cellulaire – 95DA

Temps (h)	Écart- type		Écart- type		Écart- type		Écart- type		Contrôle 1111 (cell/mm2)
	11 (cell/ mm2)	type 11 cell/m m2	111 (cell/ mm2)	111 cell/m m2	111 (cell/ mm2)	111 cell/m m2	1111 (cell/ mm2)	1111 cell/m m2	
1	11,57	4,04	2,89	52,26	4,85	68,84	760,62	76,01	344,82
2	13,11	1,45	7,52	80,22	13,70	68,84	604,02	40,23	567,57
3	16,39	2,40	10,99	85,24	9,37	43,39	832,94	77,52	216,38
4	4,62	1,73	5,78	103,56	75,47	48,02	792,06	160,72	227,95
8	6,74	1,77	13,30	103,56	1,01	47,44	857,05	62,15	750,40
24	6,94	7,56	16,19	95,07	23,07	94,30	ND	ND	959,26
48	4,43	2,33	10,99	147,14	14,86	295,64	ND	ND	433,92

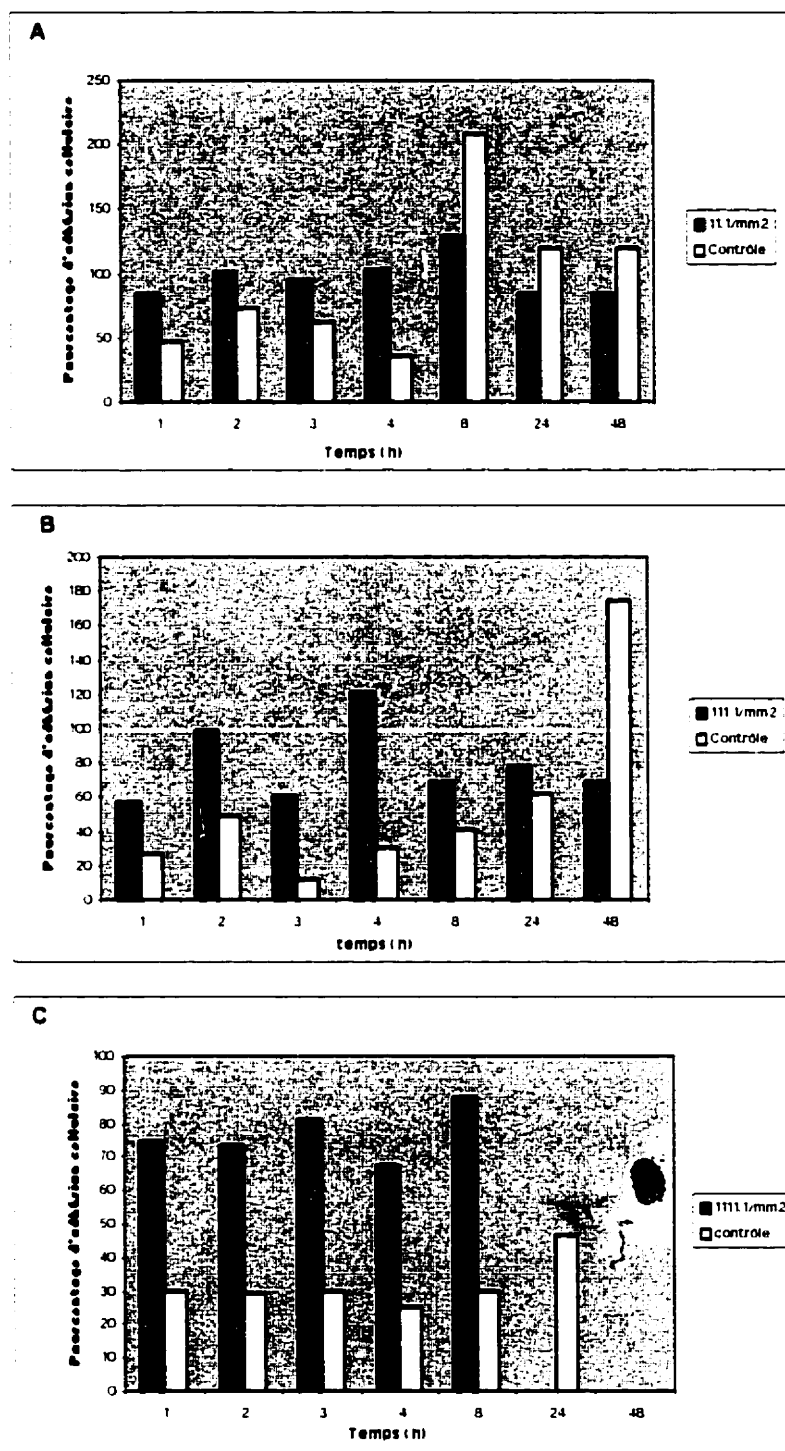


Figure 3.4. Pourcentage d'adhésion cellulaire – 91.7DA

Pourcentage = $(\text{nombre de cellules/mm}^2)_t / (\text{nombre de cellules/mm}^2)_{t_0} * 100$

A : 11, B : 111, C : 1111 cellules/mm²

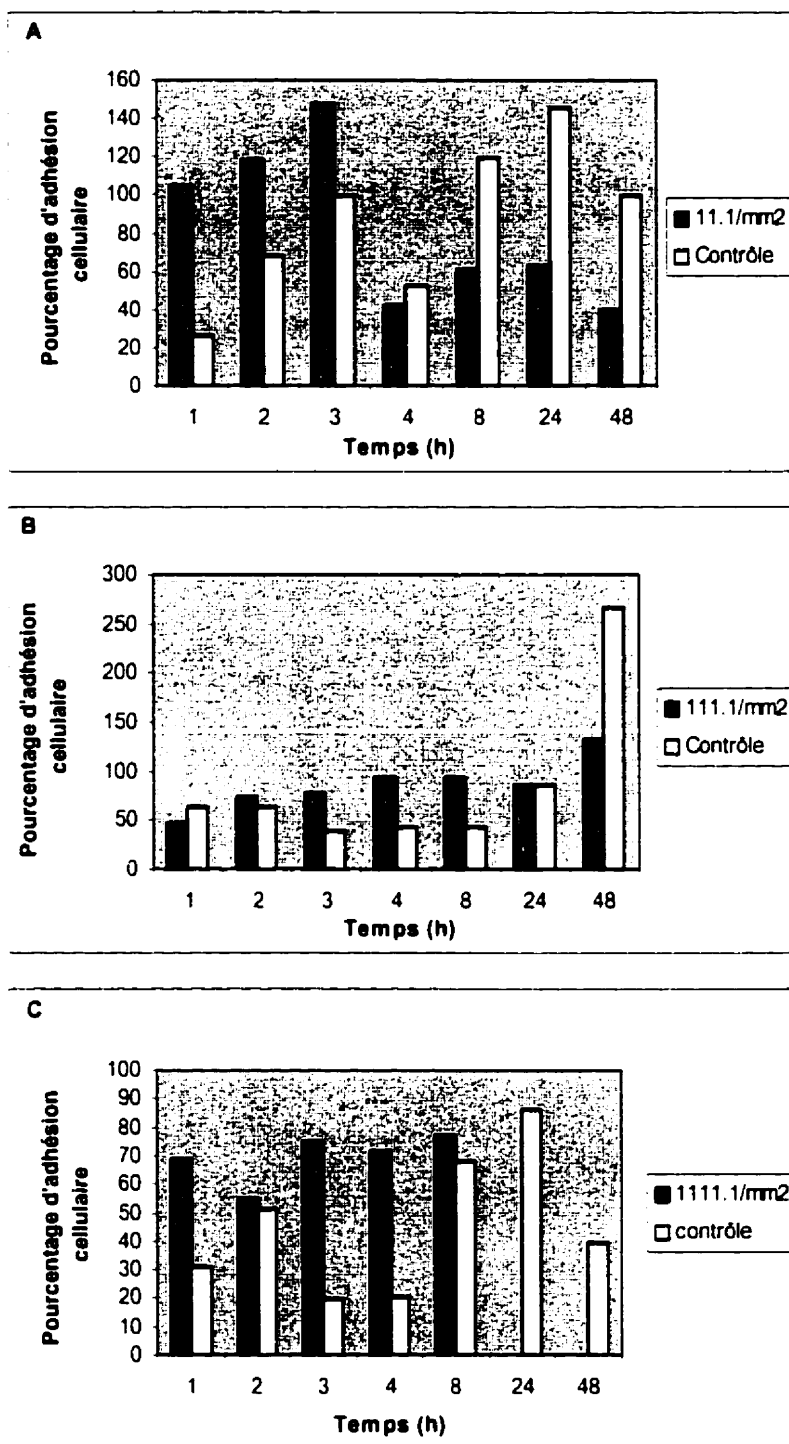


Figure 3.5. Pourcentage d'adhésion cellulaire – 95DA

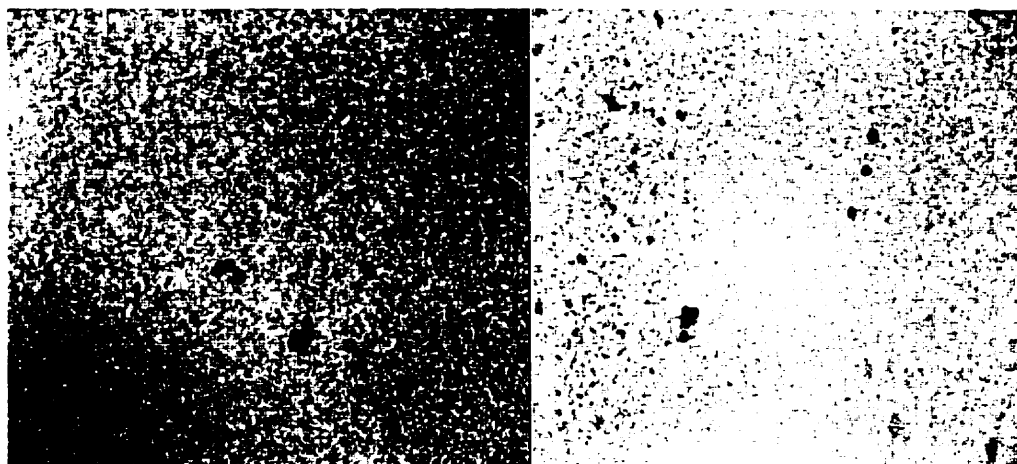
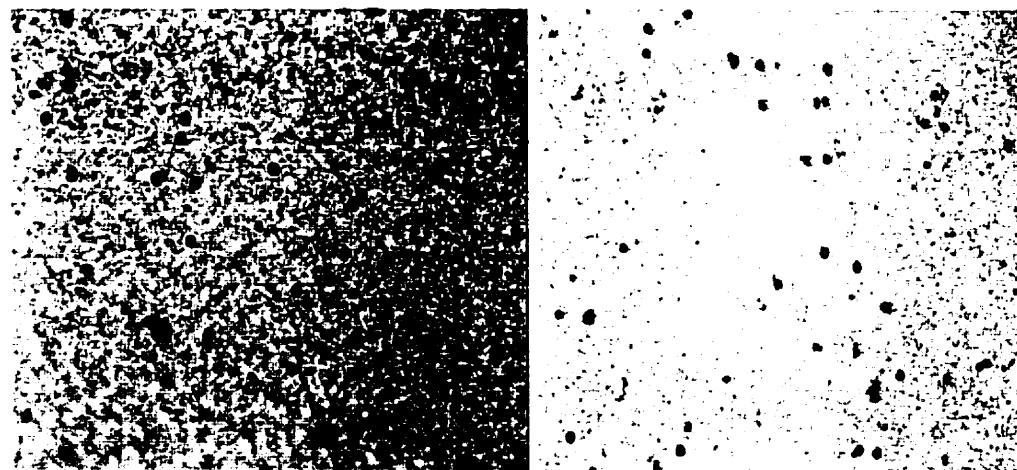
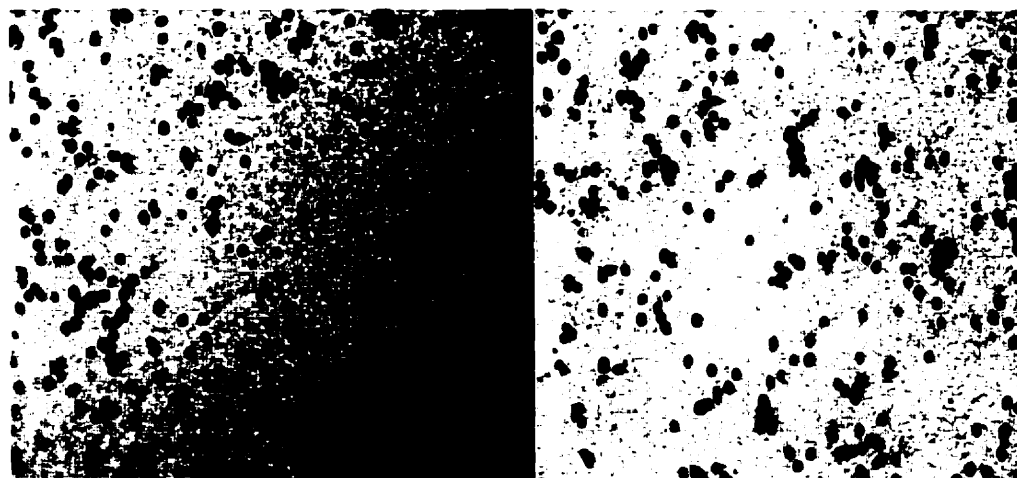
Pourcentage = $(\text{nombre de cellules/mm}^2)_t / (\text{nombre de cellules/mm}^2)_{t_0} * 100$

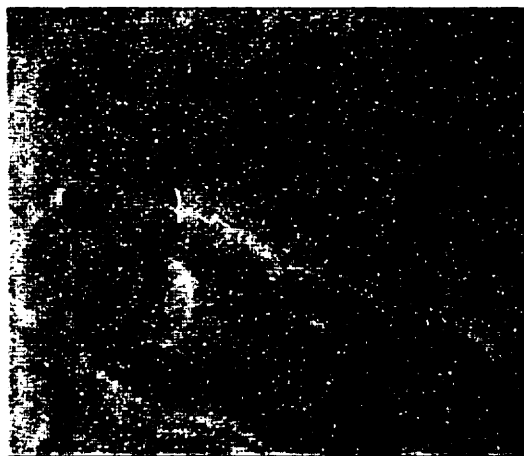
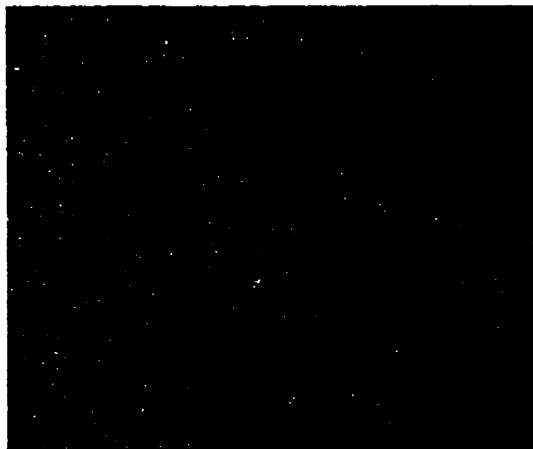
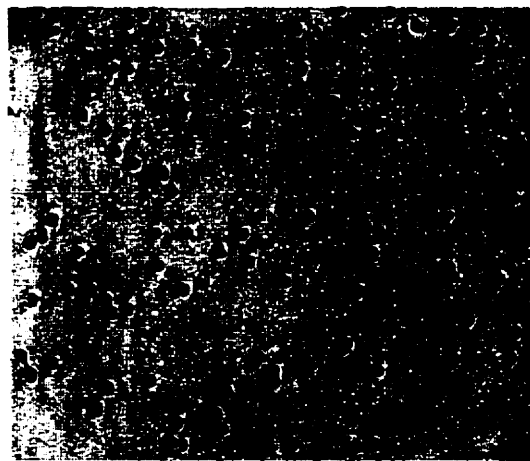
A : 11, B : 111, C : 1111 cellules/mm²

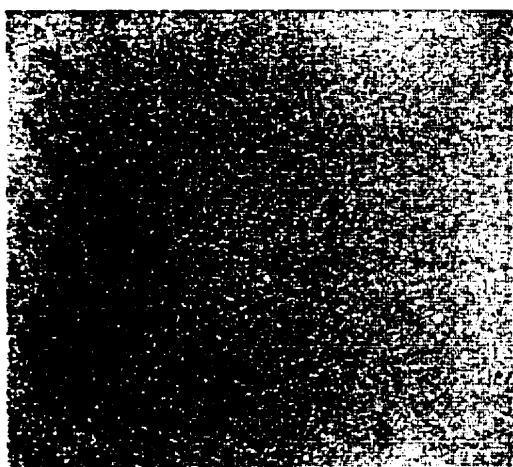
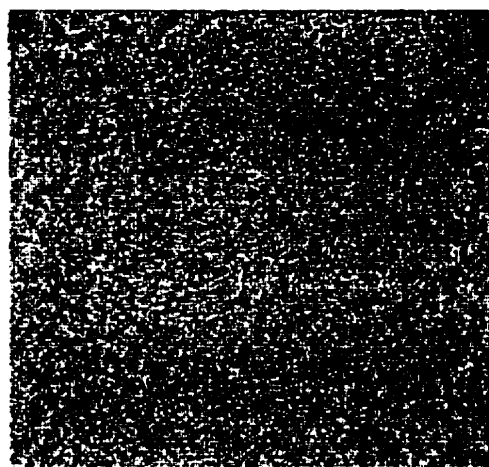
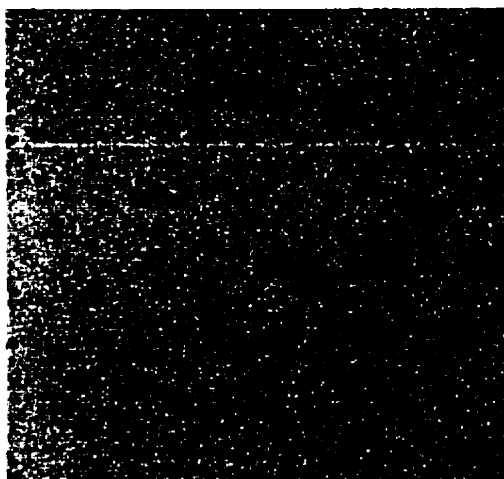
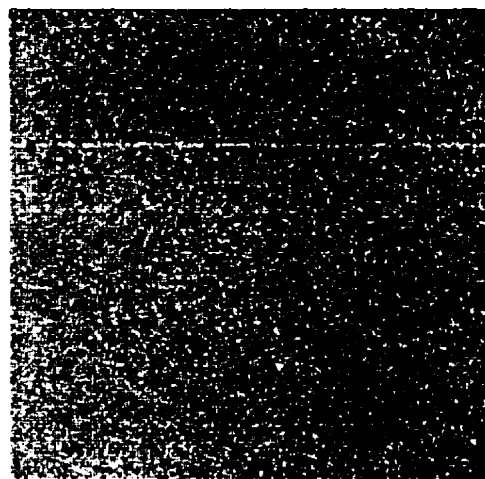
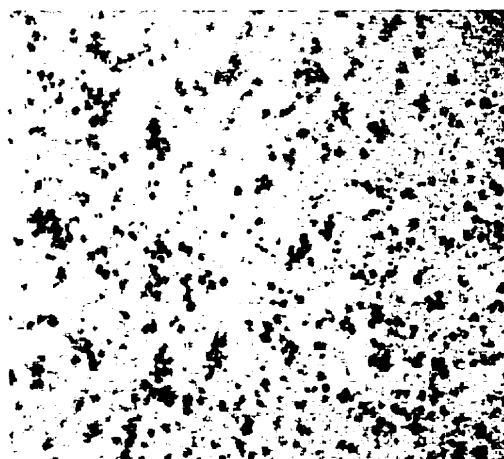
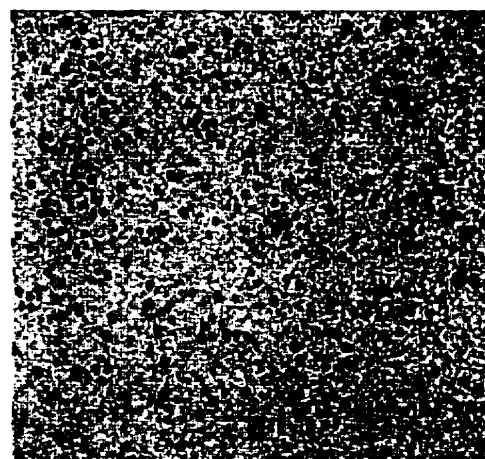
Tableau 3.5. Pourcentage d'adhésion cellulaire.

Temps (h)	11 cells./mm²	Contrôle 11 cells./mm²	111 cells./mm²	Contrôle 111 cells./mm²	1111 cells./mm²	Contrôle 1111 cells./mm²
1	83.24	46.82	56.92	26.55	74.32	29.47
2	100.59	72.84	99.27	48.94	73.27	29.15
3	95.38	62.43	60.57	11.97	81.15	29.57
4	102.32	36.42	121.14	30.19	67.33	25.10
8	128.33	208.11	68.72	40.61	87.70	30.04
24	83.24	119.66	77.92	61.95	0	46.46
48	83.24	119.66	68.55	174.94	0	0.20

Temps (h)	11 cells./mm²	Contrôle 11 cells./mm²	111 cells./mm²	Contrôle 111 cells./mm²	1111 cells./mm²	Contrôle 1111 cells./mm²
1	104.05	26.01	47.03	61.95	68.45	31.03
2	117.93	67.63	72.19	61.95	54.36	51.08
3	147.41	98.85	76.71	39.05	74.96	19.47
4	41.62	52.02	93.20	43.21	71.28	20.51
8	60.63	119.66	93.20	42.69	77.13	67.53
24	62.43	145.68	85.56	84.86	0	86.33
48	39.88	98.85	132.42	266.06	0	39.05

Résultats du test d'adhésion cellulaire à 2h.91.7DA - 11 cellules/mm²95DA - 11 cellules/mm²91.7DA - 111 cellules/mm²95DA - 111 cellules/mm²91.7DA - 1111 cellules/mm²95DA - 1111 cellules/mm²

Contrôles à 2 heures**Contrôle - 11 cellules/mm²****Contrôle - 111 cellules/mm²****Contrôle - 1111 cellules/mm²**

Résultats du test d'adhésion cellulaire à 8h.91.7DA - 11 cellules/mm²95DA - 11 cellules/mm²91.7DA - 111 cellules/mm²95DA - 111 cellules/mm²91.7DA - 1111 cellules/mm²95DA - 1111 cellules/mm²

Contrôles à 8 heures

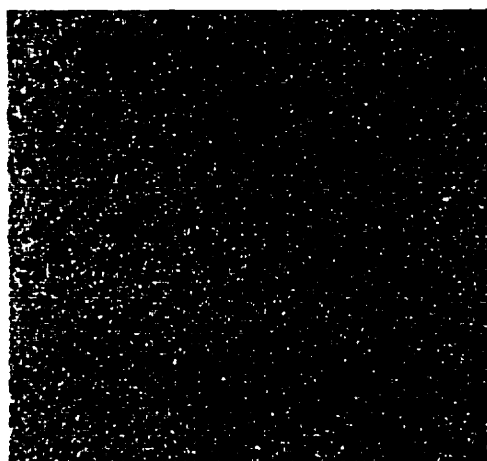
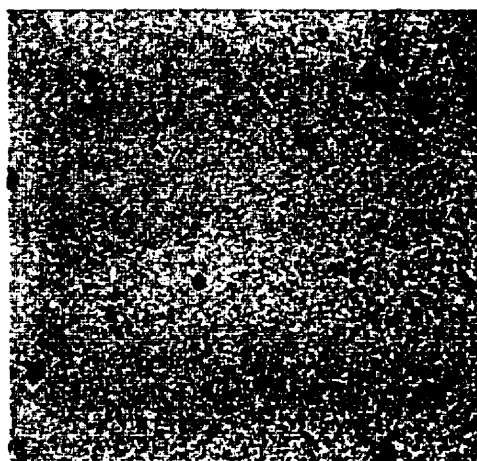
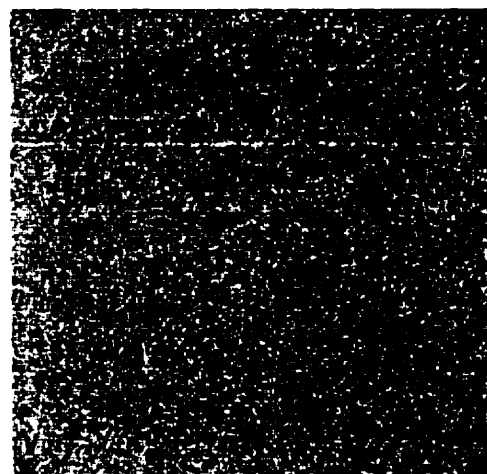
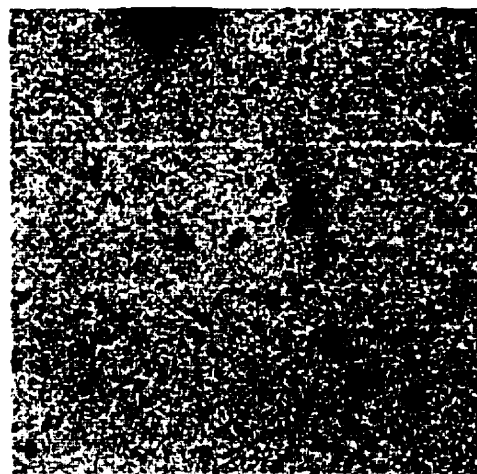
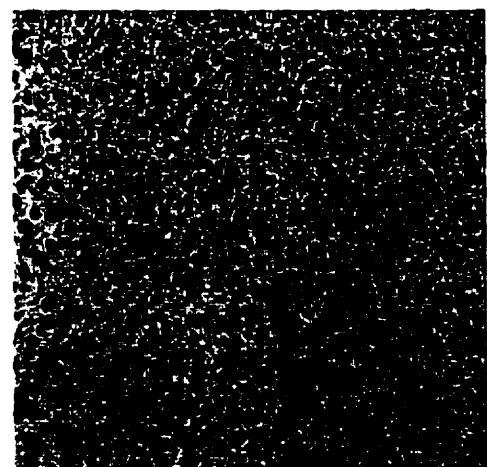
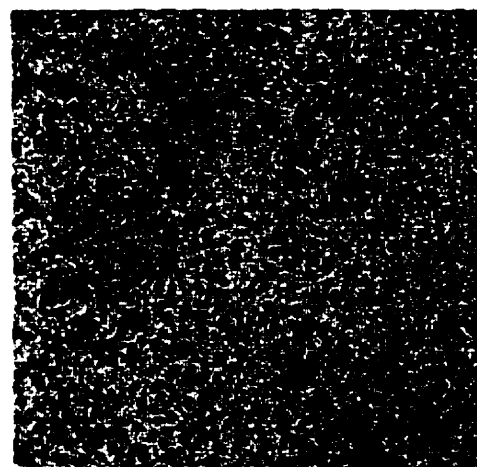
Contrôle - 11 cellules/mm²

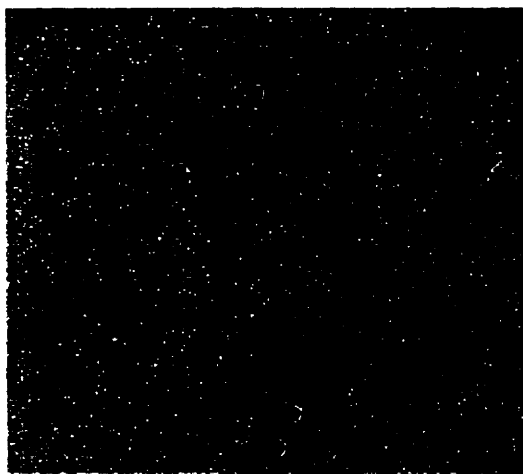
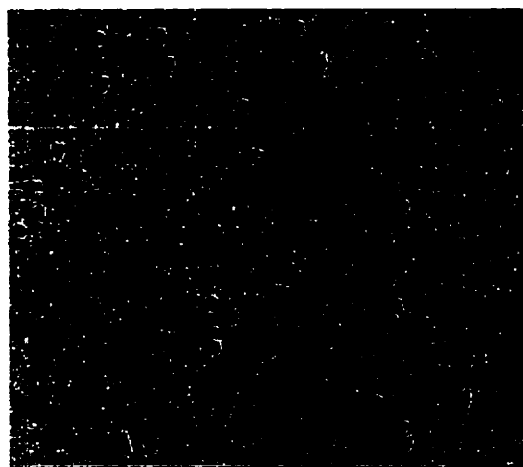


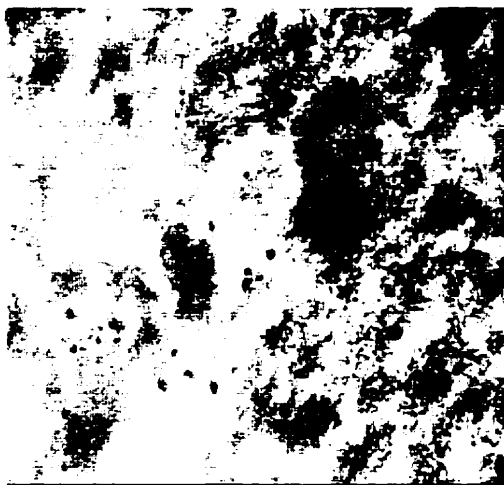
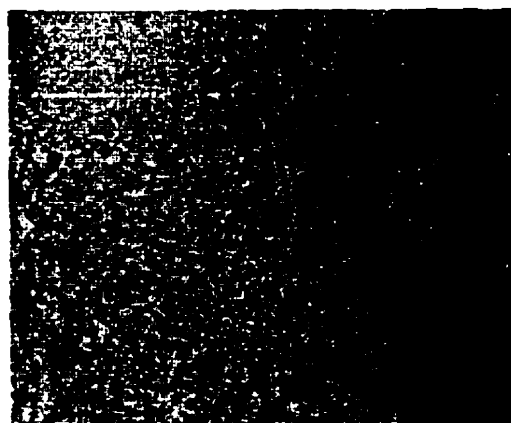
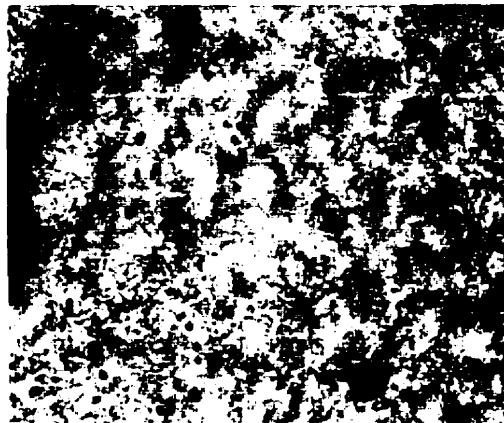
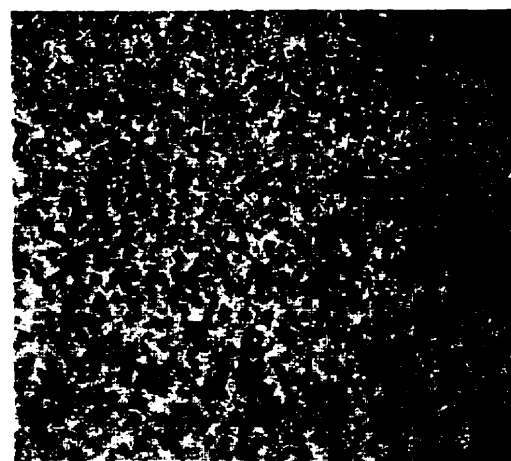
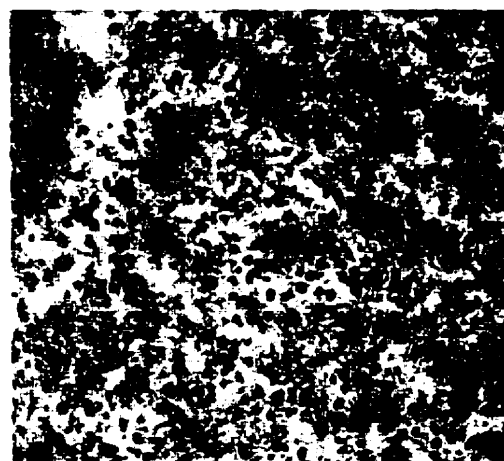
Contrôle - 111 cellules/mm²



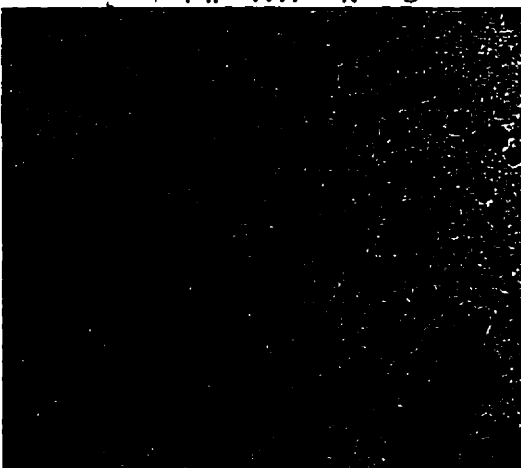
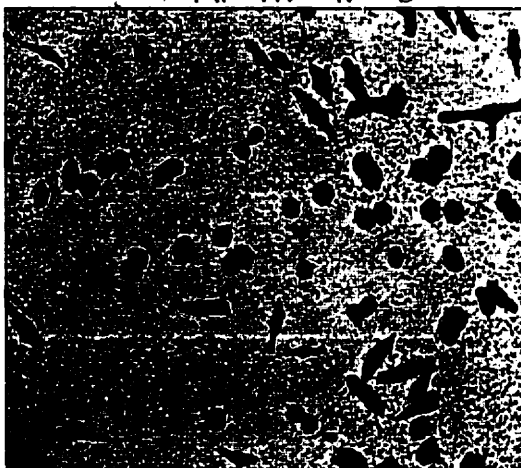
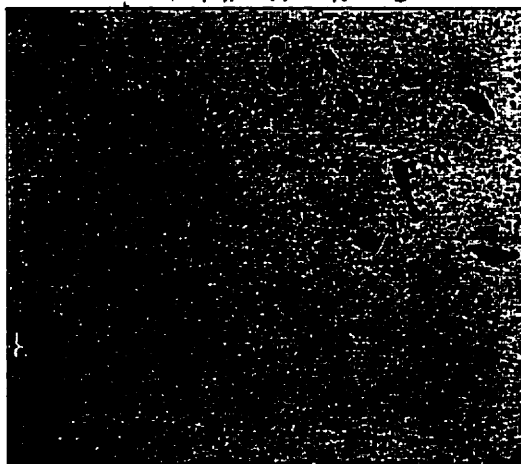
Contrôle - 1111 cellules/mm²

Résultats du test d'adhésion cellulaire à 24h.91.7DA - 11 cellules/mm²95DA - 11 cellules/mm²91.7DA - 111 cellules/mm²95DA - 111 cellules/mm²91.7DA - 1111 cellules/mm²95DA - 1111 cellules/mm²

Contrôles à 24 heures**Contrôle - 11 cellules/mm²****Contrôle - 111 cellules/mm²****Contrôle - 1111 cellules/mm²**

Résultats du test d'adhésion cellulaire à 48h.91.7DA - 11 cellules/mm²95DA - 11 cellules/mm²91.7DA - 111 cellules/mm²95DA - 111 cellules/mm²91.7DA - 1111 cellules/mm²95DA - 1111 cellules/mm²

Contrôles à 48 heures



Chapitre 4 : Discussion

Les expériences *in vivo* ont montré que les biogels à base de chitosan utilisés, entraînaient une réaction inflammatoire aiguë et chronique, qui se traduit à long terme par la formation d'une capsule mature et organisée. La dégradation du gel n'est pas totale après 120 jours. Notons que des gels désacétylés à 90%, implantés en sous-cutané sur un an ont pu être retrouvés, montrant que la biodégradation de ce matériau est lente. L'analyse histopathologique des implants a révélé la présence de nombreux types cellulaires, avec prédominance de macrophages et de PMNs. Il a été montré que la chitine et le chitosan avaient un effet chimioattractif pour les PMNs^(55,35) et les macrophages⁽²²⁾. Il semblerait que cet effet soit dû en grande partie au résidu D-glucosamine (Glc) du polymère⁽³⁵⁾. Peluso *et al.* ont montré pour leur part que le résidu N-acétylglucosamine (NAGA) était responsable de l'activation des macrophages, entraînant une production et une libération de NO dans le milieu environnant⁽²²⁾. On voit déjà ici la complémentarité des rôles des deux résidus composant le chitosan.

D'autre part, Usami *et al.* ont montré que le chitosan avait un effet chimioattractant sur les PMNs selon 4 voies distinctes. Tout d'abord, par attraction directe, comme on vient de le mentionner. De plus, la chitine et le chitosan induisent une production d'interleukine 8 (IL-8) par les fibroblastes chez la souris et le rat⁽²⁾. Or, l'IL-8 est un facteur chimioattractif important pour les PMNs. Par conséquent, la chitine et ses dérivés exercent un effet chimioattractif également par la voie des cytokines. Par ailleurs, la chitine et le chitosan induisent la production d'anaphylatoxine C5a par la voie alterne du complément^(23,25). Or on sait que le C5a est un facteur chimioattractif également pour les PMNs. La voie alterne du complément est donc une troisième voie par laquelle la chitine et ses dérivés exercent leur effet attractif sur les PMNs. Enfin, les auteurs ont également montré que la chitine et le chitosan induisaient la production de leucotriène B4 par les PMNs, un dérivé de l'acide arachidonique ayant lui aussi un effet chimioattractif pour ce type cellulaire⁽²⁵⁾.

Tout ceci montre à l'évidence le rôle attractif du chitosan sur les cellules impliquées dans les phénomènes d'inflammation. On a déjà parlé également du rôle d'activateur de ces types cellulaires joué par le chitosan. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux phénomènes d'attachement des macrophages à la surface du chitosan, et d'adsorption de protéines sur le chitosan. Plusieurs auteurs rapportent cependant l'existence d'un récepteur membranaire sur les macrophages, qui serait spécifique pour le résidu NAGA^(39,22). D'autre part, on sait que les macrophages adhèrent à la surface de tout biomatériau dont la surface a adsorbé des protéines, par l'intermédiaire de différentes molécules de liaisons, comme les intégrines par exemple, qui reconnaissent plusieurs protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC). La liaison des macrophages à la surface du biomatériau induit une activation des macrophages qui est à l'origine de très nombreux phénomènes inflammatoires : production de cytokines, chimioattraction d'autres types cellulaires, phagocytose et éventuellement présentation d'antigènes aux lymphocytes, activation d'autres types cellulaires comme les fibroblastes qui vont produire une matrice de collagène, etc. Certains effets sont bénéfiques pour la cicatrisation ou la dégradation du biomatériau (activation des fibroblastes, synthèse d'une MEC autour de l'implant, réorganisation des tissus, expression de facteurs angiogènes ou de facteurs de croissance, etc.), d'autres sont plus néfastes. Par exemple, de nombreux articles rapportent une activation de la production du NO par le chitosan, or le NO peut amplifier la réaction inflammatoire et avoir de nombreux effets destructifs sur le matériau et les tissus environnants⁽²²⁾. La fusion de plusieurs macrophages pour former des cellules géantes est également un aspect négatif de l'activation des macrophages.

Kao évoque la possibilité de mettre à profit les effets bénéfiques des macrophages, en évitant les effets indésirables⁽⁵⁶⁾. Il propose par exemple de bénéficier des propriétés d'activateur cellulaire pour accélérer les processus de réparation (production de facteurs de croissance, angiogénèse), tout en évitant au maximum la production de NO ou l'apparition de cellules géantes. Ceci passe bien entendu par la compréhension des phénomènes mettant en contact les macrophages et le biomatériau, que ça soit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, de protéines adsorbées sur le

matériau, ou d'opsonines, comme le C3, les IgG ou la fibronectine, qui adhèrent aux matériaux étrangers, qui pourront ensuite être phagocytés.

Les expériences *in vitro* ont montré clairement que les macrophages adhéraient à la surface du chitosan. Deux scénarios sont donc envisageables. On a vu que les macrophages possédaient des récepteurs spécifiques pour certains résidus du chitosan. D'autre part, les cellules possèdent de nombreux récepteurs membranaires capables de se lier aux glucosaminoglycanes (GAG). Certains polysaccharides, comme le kératane sulfate et certains oligosaccharides O- ou N- liés, possèdent entre autres le résidu NAGA comme constituant structural. Il n'est donc pas improbable que les cellules puissent se lier au chitosan également par l'intermédiaire du résidu NAGA. La première possibilité est donc un contact direct entre le polymère et les cellules. L'autre possibilité est l'adsorption de protéines en surface du gel, permettant ainsi un attachement des cellules. La probabilité que des protéines adhèrent aux gels est très importante, compte tenu de leur grande diversité et de leur forte propension connue à adhérer sur la plupart des surfaces. Elles sont présentes en grand nombre dans le sérum de veau fœtal utilisé lors de la culture de cellules. Elles pourraient donc servir d'intermédiaires lors de l'attachement des cellules sur le chitosan, mais leur encombrement stérique pourrait empêcher la liaison directe entre les résidus NAGA du chitosan et les cellules. Plusieurs protéines peuvent interagir avec le chitosan, mais il semble que la fibronectine soit une des plus probables, puisque les données que l'on a sur cette protéine semble montrer qu'elle aurait la possibilité de se lier à la fois les cellules et le chitosan. L'albumine est également très présente dans le sérum, et cette protéine est aussi connue pour adhérer sur de nombreux types de surfaces.

En ce qui concerne la fibronectine, une littérature abondante concerne une séquence tripeptidique composée d'arginine, de glycérine et d'aspartate (RGD) que l'on retrouve dans plusieurs protéines de la MEC, dont la fibronectine, et qui est reconnue par plusieurs types cellulaires⁽⁵⁶⁾. Les macrophages possèdent plusieurs récepteurs membranaires qui reconnaissent ce tripeptide, et permettent ainsi un attachement des

macrophages à cette protéine. De plus, Un domaine de la fibronectine lui permet de se lier au récepteur C3 des monocytes⁽⁵⁷⁾. Ceci induit la production du facteur plasminogène et de facteurs de croissance par les cellules activées par cette liaison. La fibronectine est connue pour favoriser l'attachement des monocytes-macrophages ainsi que leur activité phagocytaire. On la retrouve autour de nombreuses cellules dans tous les phénomènes de reconstruction tissulaire. Les macrophages peuvent donc se lier à la fibronectine si cette dernière est adsorbée à la surface du chitosan.

D'autre part, la fibronectine possède de nombreux domaines différents reliés entre eux par des domaines riches en cystéine, formant des ponts disulfures⁽⁵⁷⁾. Ces derniers ont pour rôle de maintenir la protéine sous forme repliée afin de lui assurer sa fonctionnalité⁽⁵⁸⁾. Par ailleurs, plusieurs auteurs rapportent la présence d'un domaine peptidique de 30 à 43 résidus, très conservé chez les plantes et les invertébrés, et contenant 4 ponts disulfures⁽⁵⁹⁾. Ce site se retrouve dans la plupart des protéines pouvant se lier à la chitine. Il semble que ce groupe de 4 ponts disulfures puisse établir des liaisons avec le résidu NAGA⁽⁶⁰⁾. La fibronectine peut donc se lier au chitosan par l'intermédiaire de ces sites riches en cystéines. Nishimura *et al.* ont également montré que la fibronectine bovine se pouvait se lier à un dérivé carboxyméthylé de la chitine⁽⁶¹⁾.

La fibronectine possède 4 domaines principaux. Un premier domaine lui permet de se lier à la surface membranaire des cellules. On a déjà parlé des macrophages, mais elle peut également se lier aux fibroblastes grâce à un récepteur membranaire différent de celui mis en jeu dans le cas des macrophages. Elle a de plus un effet chémoattractant pour les fibroblastes et favorise l'adhésion intercellulaire⁽⁵⁷⁾. Un autre domaine lui permet de se lier à la fibrine et au fibrinogène, grandement présents durant les processus inflammatoires. Un autre domaine lui permet de se lier au collagène. Elle peut se lier de la même façon aux GAG comme l'héparine ou l'héparane sulfate. Rappelons que Mori *et al* ont suggéré que le chitosan pourrait former un complexe polyélectrolyte avec l'héparine, qui serait responsable des effets biologiques du chitosan sur l'accélération de

la reconstruction tissulaire⁽²⁾. L'héparine a en effet des effets angiogènes, et elle stabilise le FGF, favorisant ainsi la croissance des fibroblastes. On voit ici la complexité des relations entre les différents éléments (cellules, protéines, facteurs de croissance, etc.) intervenant dans les processus de remodelage des tissus. Rappelons aussi que la fibronectine joue un rôle d'opsonine pour la phagocytose de matériel étranger. Elle pourrait donc être un médiateur de la phagocytose observée *in vivo* chez le rat.

Ceci montre à l'évidence que de nombreuses interactions complexes sont à l'origine de l'adhésion des macrophages à la surface du chitosan. De plus amples recherches seraient nécessaires afin de mieux comprendre les phénomènes d'adsorptions de protéines sur le chitosan, afin de pouvoir moduler la réponse de l'hôte et l'orienter favorablement en terme de biocompatibilité. Par exemple, une culture de cellules utilisant du FBS ne contenant plus de fibronectine, permettrait d'affiner notre compréhension du phénomène d'adsorption des protéines en surface du chitosan. D'autres protéines se retrouveraient certainement en surface des gels, et il faut garder à l'esprit que la fibronectine peut être synthétisée par les cellules elles-même, mais une tendance différente dans les premiers temps de l'expérience permettrait de montrer que cette protéine joue effectivement un rôle précoce dans l'adhésion cellulaire en surface des gels étudiés. Enfin, il pourrait être intéressant de cultiver les macrophages en présence du gel sans FBS afin de savoir si l'interaction entre les cellules et la surface ne s'opère que par l'intermédiaire de protéines ou si un récepteur membranaire des macrophages peut interagir avec le chitosan.

Chapitre 5 : Conclusions

Les polymères biodégradables constituent un champ d'investigation très large de par leurs nombreuses applications. Outre quelques applications dans le domaine de l'environnement, comme les emballages recyclables, ils sont surtout très présents dans le domaine biomédical. On peut citer brièvement l'intérêt de ces biomatériaux en ce qui concerne les sutures biorésorbables, les systèmes de libération contrôlée d'agents thérapeutiques, ou l'ingénierie tissulaire.

La chitine et ses dérivés ont montré depuis quelques décennies des propriétés particulières prometteuses, permettant d'envisager son utilisation dans des applications biomédicales variées. La somme des articles relatifs aux dérivés de la chitine et du chitosan, et le nombre de conférences ou de symposiums consacrés à ces biopolymères en disent long sur l'intérêt grandissant que le monde scientifique leur porte.

La formulation originale brevetée par Bio Syntech Canada, Inc présente des propriétés de gélation intéressantes à 37°C. Les études *in vivo* faites dans le cadre de cette maîtrise ont souligné le rôle primordial joué par le degré de déacétylation en ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, et le comportement en milieu biologique. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'adhésion pour les macrophages de souris en surface de deux chitosans de dda différents. Les gels lyophilisés implantés ont montré un bon comportement *in vivo*, caractérisé par une présence cellulaire moindre et une capsule organisée et plus fine autour des implants. Ce type d'implant lyophilisé présente une structure délétaire qui s'adapte particulièrement à des applications comme la régénération de tissu osseux ou de cartilage. A titre d'exemple, Muzzarelli et ses collaborateurs utilisent depuis quelques années des éponges de MPC pour la réparation tissulaire^(53,54). Plusieurs molécules y ont été incorporées, comme la BMP (*Bone Morphogenic Protein*) afin d'étudier les propriétés de libération

contrôlée du gel et les conséquences sur la régénération tissulaire. Ils obtiennent des résultats encourageant pour cette formulation.

Forts de ces résultats, il serait intéressant de connaître de façon plus précise les inter-relations *in vivo* entre le chitosan et les différents constituants biologiques, afin d'une part de mieux prévoir le comportement de ce type de biomatériaux pour des applications chez l'homme, et d'autre part, pourquoi pas, d'exploiter les effets bénéfiques de la réponse en atténuant ou en éliminant les effets indésirables.

Bibliographie

- [1]. CHENITE A., *et al.* Int. Pat. Appl. PCT/CA98/00326.
- [2]. TAKASHI M. *et al.* **Effect of chitin and it derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro.** Biomaterials,(1997);18:947-53
- [3]. NISHIMURA K. *et al.*, **Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea pigs.**(1985),Vaccine;3:379-84
- [4]. MATTIOLI-BELMONTE M. *et al.*, **Chitin and chitosan in wound healing and other biomedical applications.** Carbohydr in Europe,(19 Déc. 1997);30-36
- [5]. WEINER ML., **An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceuticals ingredients.** Advances in chitin and chitosan. Ed. CJ Brine, PA Sandford, JP Zikakis. Elsevier Applied Science, London and New York.
- [6]. DODANE V. AND VILIVALAM VD., **Pharmaceutical applications of chitosan.** PSTT,(1998);1:246-53
- [7]. ANDERSON JM. AND MILLER KM. **Biomaterial biocompatibility and the macrophage.** Biomaterials,(1984);5:5-10
- [8]. MUZZARELLI R.A.A., ed., **Role and fate of exogeneous chitosans in human wound tissues.** Chitin Enzymology, Eur. Chitin Soc., Ancona,(1993)
- [9]. ZIELINSKI B.A. AND P. AEBISCHER, **Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation.** Biomaterials,(1994);15:1049-56
- [10]. SUNDARARAJAN VM. AND MATTHEW HWT., **Porous chitosan scaffolds for tissue engineering,** Biomaterials,(1999);20:1133-1142
- [11]. BIAGINI G. *et al.* **Osteoinduction by Chitosan-Complexed BMP: Morpho-Structural Responses in an Osteoporotic Model.** J of Bioact Compat Polym,(1997);12:321-30
- [12]. GIUNCHEDI P. *et al.* **Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres.** Biomaterials(1998);19:157-

- [13]. BELMONTE-MATTIOLI M. *et al.* **Bioactivity modulation of bioactive materials in view of their application in osteoporotic patients.** J of Mater Sci,(1998);9:485-94
- [14]. BELMONTE-MATTIOLI M. *et al.* **Cellular Engineering - N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage.** Med Biol Eng Comput,(1999);37:130-4
- [15]. CHANDY T. *et al.* **Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation.** Art org,(1999);23:894-903
- [16]. LEE KY *et al.* **Preparation of self-aggregates as a gene delivery system. J controlled release.**(1998);51:213-20
- [17]. RAO SB. AND SHARMA CP. **Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential.** J Biomed Mater Res,(1997);34:21-8
- [18]. BEENA M.S. *et al.* **Heparin immobilized chitosan-polyethyleneglycol interpenetrating network : antithrombogenicity.** Artif. cell blood subs. immob. Biotech.,(1995);23:175-192
- [19]. KIKUSHI Y., **Polyelectrolyte complex of heparin with chitosan, Die Makromol Chem.**(1974);175:2209-2211
- [20]. KOCH A.E. *et al.*, **Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.** Science,(1992);258:1798-1801
- [21]. TEUSCHIL A. *et al.* **Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation.** J. Invest. Dermatol.,(1992);99:294-298
- [22]. PELUSO G. *et al.*, **Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. Biomaterials.**(1994);15:1215-20
- [23]. MINAMI S., **Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway.** Carbohydr polym,(1998);36:151-155
- [24]. MUZZARELLI R.A.A. *et al.*, **Osteoconductive properties of methylpyrrolidinone chitosan in an animal model.** Biomaterials,(1993);14:925-29
- [25]. USAMI Y. *et al.*, **Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2.** J Biomed Mater Res,(1998);42:517-22

- [26]. NISHIMURA K. *et al.* **Immunological activity of chitin and its derivatives.** Vaccine,(1984);2:93-96
- [27]. NISHIMURA K. *et al.* **Macrophages activation with multiporous beads prepared from partially deacetylated chitin.** J Biomed Mater Res,(1986);20:1359-1372
- [28]. HIGUSHI M. *et al.* **Cytolytic Mechanisms of activated macrophages : tumor necrosis factor and L-Arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages.** J. Immunol.,(1990);144:1245-1251
- [29]. DONG Z. *et al.* **Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages.** J. Immunol.,(1993);151:2717-2724
- [30]. MUZZARELLI R.A.A. *et al.*, **Biological activity of chitosan : ultrastructural study.** Biomaterials,(1988);141:2407-2412
- [31]. USAMI Y. *et al.*, **Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan.** J. Vet. Med. Sci.,(1994);56:1215-1216
- [32]. MINAMI S. *et al.*, **Chitosan inducing hemorrhagic pneumonia in dogs.** Carbohydr polym.,(1996);29:241-246
- [33]. PANGBURN SH. *Et al.* **Partially deacetylated chitin : its use in self-regulated drug delivery systems;** 'Chitin, chitosan and related enzymes', Academic Press, 1984. ISBN 0-12-780950-3
- [34]. MAJETI NV. AND KUMAR R.. **A review of chitin and chitosan applications.** React and function polym,(2000);46:1-27
- [35]. USAMI Y. *et al.* **Effect of N-Acetyl-D-Glucosamine and D-Glucosamine oligomers on canine polymorphonuclear cells in vitro.** Carbohydr polym.,(1998),36:137-41
- [36]. SUZUKI K. *et al.* **Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on Activation of Phagocytes.** Microbiol. Immunol.,(1986);30:777-787

- [37]. WARR GA. *et al.* **A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity.** Biochem. Biophys. Res. Commun.,(1980);93:737-45
- [38]. MUZZARELLI RAA. *et al.* **Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing.** In: P. Jolles, R.A.A. Muzzarelli (Eds), chitin and chitinases, Birkhauser, Basel,1999
- [39]. MUZZARELLI RAA.. **Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives.** Review. Cell. Mol. Life. Sci. (1997);53:131-140.
- [40]. Biagini G. *et al.* **Wound management with N-carboxybutyl chitosan.** Biomaterials,(1991);12:281-6
- [41]. SAGAR B., HAMLYN P., WALES D., Eur. Patent 0460774 A2 (1991)
- [42]. JAMEELA *et al.* **Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs.** J. Biomaterials Sci. Polym. Edn.,(1994);61:621-632.
- [43]. REMUÑÁN-LOPEZ C. *et al.* **Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films.** J. Controlled Release,(1997);44:215-225.
- [44]. TAKEUSHI H. *et al.* **Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes.** Pharm. Res.,(1996);13:896-901
- [45]. YAO KD. *Et al.* **Microcapsules/Microspheres related to chitosan.** J.M.S-rev. Macromol. Chem. Phys., (1995);C35:155
- [46]. CALVO P. *et al.* **Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers.** J of Appl Polym Sci,(1997);63:125-33
- [47]. CHANDY T. *et al.* **Chitosan beads and granules for oral sustained delivery of Nifedipine : in vitro studies.** Biomaterials,(1992);13:949
- [48]. CHANDY T. *et al.* **Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin.** Biomaterials,(1993);14:939-45
- [49]. CHELLAT F. *et al.* **In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex.** J. Biomed Mater Res. (2000 Jul);51:107-116

- [50]. CHENITE A. *et al.* **Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions.** Carbohydr Polymers. *In Press.*
- [51]. CHENITE A. *et al.* **Novel Injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ.** Biomaterials,(2000);21:2155-61
- [52]. NISHIMURA K. *et al.* **Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea pigs.** Vaccine,(1985);3:379-84
- [53]. MUZZARELLI RAA. *et al.* **Osteoinduction by Chitosan-complexed BMP : morpho-structural responses in an osteoporotic model.** J. of bioact and compat polym.(1997);12:321-29
- [54]. MATTIOLI-BELMONTE M *et al.* **N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenic protein in the repair of articular cartilage.** Med. and Biol. Eng. & Comput.,(1999);37:130-4
- [55]. USAMI Y. *et al.* **Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan.** J. Vet. Med. Sci.,(1994);56:1215-6
- [56]. KAO WJ.. **Evaluation of protein-modulated macrophages behavior on biomaterials: designing biomimetic materials for cellular engineering.** Biomaterials,(1999);20:2213-21
- [57]. MOSHER DF. **Biology of extracellular matrix. Fibronectin.** Ed. Mosher. 1989
- [58]. CHEN Z., JACOBS-LORENA M. **Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates.** J. Mol. Evol.,(1999);48:341-7
- [59]. SUETAKE T. *et al.* **Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif.** J. Biol. Chem.,(2000);275:17929-32
- [60]. ASENSIO JL. *et al.* **Structural basis for chitin recognition by defense proteins : GlcNac residus are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains.** Chem. Biol.,(2000);7:529-43
- [61]. NISHIMURA SI. *et al.* **The adsorption of bovine blood proteins onto the surface of O-(carboxymethyl)chitin.** Carbohydrate Research,(1984);134:305-12

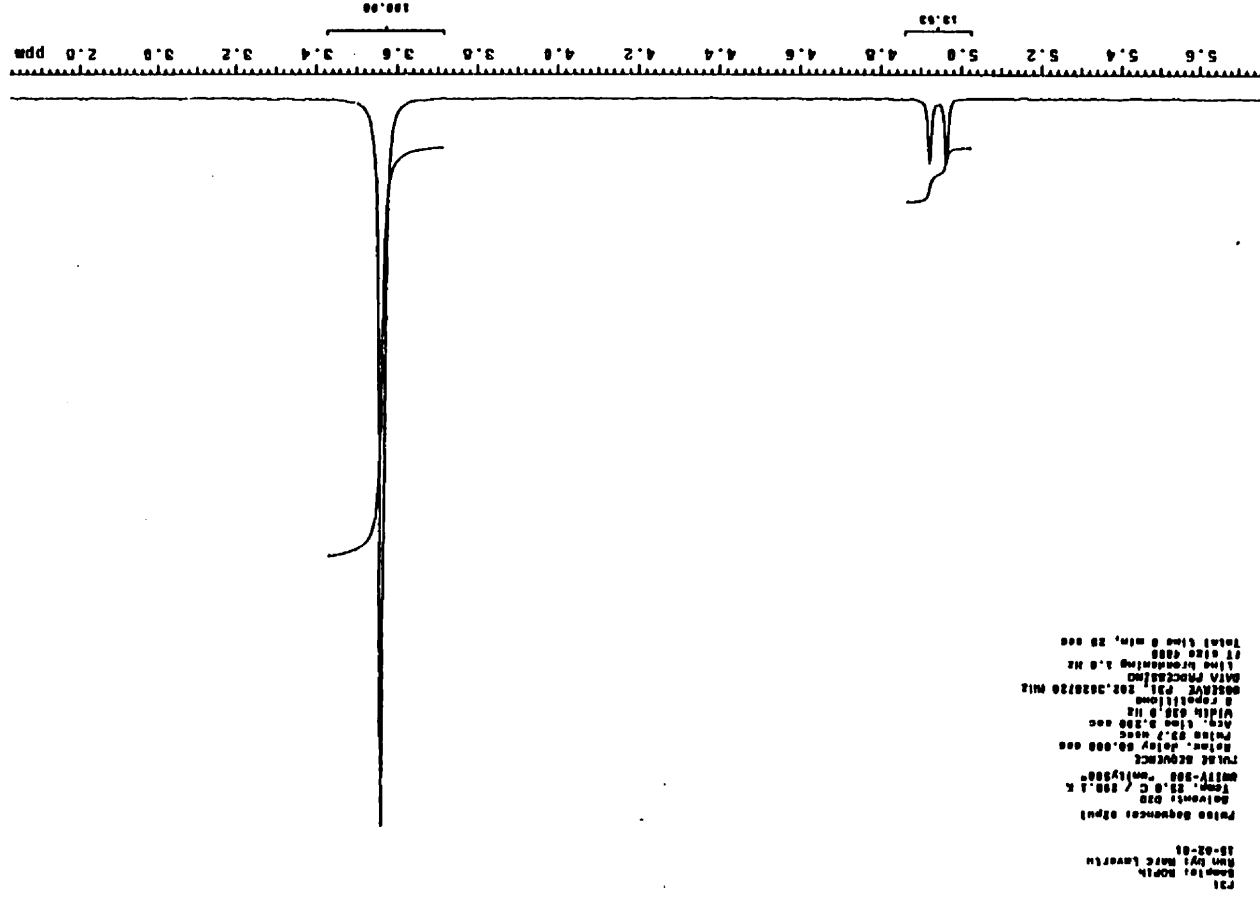
- [62]. ANDERSON JM.. **Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices.** Cardiovascular Pathology,(1993);2:33S-41S
- [63]. KHOUW MSL. *et al.* **The foreign body reaction to a biodegradable biomaterial differs between rats and mice.** J Biomed Mater Res,(2000);52:439-46
- [64]. OTTERLEI M. *et al.* **Characterization of binding and TNF- α -inducing ability of chitosans on monocytes:the involvement of CD14.** Vaccine,(1994);12:825-832
- [65]. TSAI GJ AND SU WH. **Antibacterial activity of shrimp chitosan against Escherichia coli.** J Food Prot(1999),62:239-43
- [66]. HAN, S-M, PhD web site. <http://user.chollian.net/~chitin/intro.html>
- [67]. PANTALEONE D. *et al.* **Susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis.** Adv. In chitin and chitosan (Eds Elsevier Appl.Sci.), 1992:292-303
- [68]. MUZZARELLI RAA. *et al.* **Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan.** Biomaterials,(1994);15:1075-81

ANNEXES

A SPECTRES RMN DE LA LIBÉRATION DE GP

B RÉSULTATS DES TESTS STATISTIQUES

ANNEXE A



721
 Sample: 100%
 Run by: MRC Laverly
 10-01-01
 Pulse sequence: zgpg30
 Date_01: 01/01/2001
 Time: 11:00:00
 Temp: 25.0 C / 77.0 F
 QNP: 1H
 P1: 12.00 sec
 d1: 0.05 sec
 Width: 0.00 Hz
 Frequency: 500.13 MHz
 Data processing: F2
 F2: 500.13 MHz
 F1: 500.13 MHz
 Total time: 0 min, 20 sec

Pulse Sequences: signal

Channel 1, 2, 3 / 200.1 K
Pilot information: 15-02-01
Unit: 15-02-01

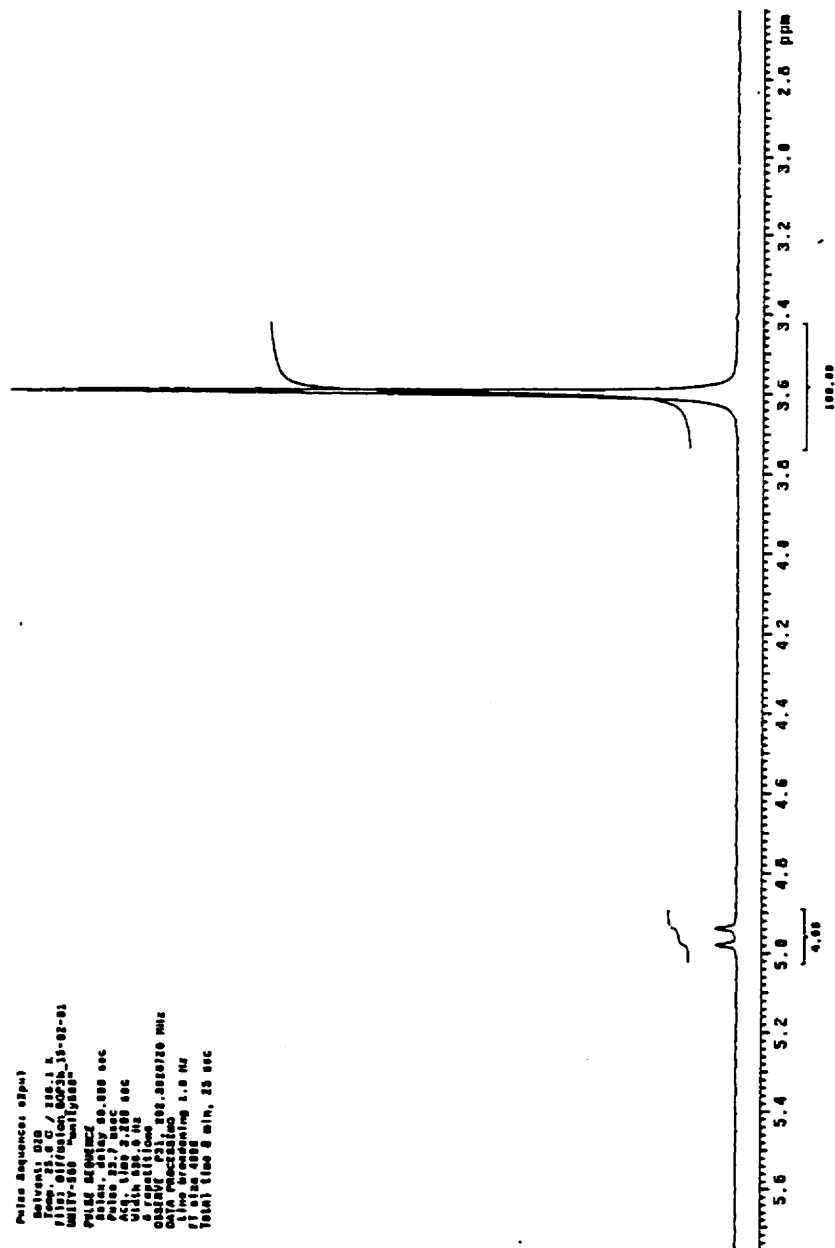
PULSE SEQUENCE

Pulse 1: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 2: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 3: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 4: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 5: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 6: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 7: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 8: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 9: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 10: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 11: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 12: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 13: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 14: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 15: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 16: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 17: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 18: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 19: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 20: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 21: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 22: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 23: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 24: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 25: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 26: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 27: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 28: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 29: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 30: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 31: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 32: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 33: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 34: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 35: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 36: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 37: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 38: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 39: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 40: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 41: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 42: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 43: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 44: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 45: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 46: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 47: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 48: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 49: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 50: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 51: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 52: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 53: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 54: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 55: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 56: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 57: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 58: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 59: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 60: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 61: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 62: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 63: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 64: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 65: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 66: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 67: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 68: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 69: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 70: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 71: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 72: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 73: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 74: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 75: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 76: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 77: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 78: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 79: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 80: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 81: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 82: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 83: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 84: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 85: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 86: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 87: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 88: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 89: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 90: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 91: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 92: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 93: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 94: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 95: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 96: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 97: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 98: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 99: 1.0 sec, 100 sec
Pulse 100: 1.0 sec, 100 sec

DATA PROCESSING

Total time 8 min, 25 sec

P21
 Run: 101, 4029h
 Run Date: 10/10/82
 15-02-01
 Pulse Sequences: 02p41
 Solvent: D2O
 Temp: 25.0 C / 216.1 F
 P1: 1.00 sec, 0.00 sec, 15-02-01
 M17: 0.00 sec, 0.00 sec, 15-02-01
 PULSE SEQUENCE
 Pulse, delay 90.000 sec
 Pulse 12.7 sec
 Delay 2.000 sec
 Width 0.000 sec
 5 repetitions
 Q1: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q2: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q3: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q4: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q5: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q6: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q7: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q8: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q9: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q10: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q11: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q12: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q13: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q14: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q15: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q16: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q17: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q18: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q19: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q20: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q21: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q22: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q23: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q24: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q25: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q26: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q27: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q28: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q29: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q30: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q31: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q32: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q33: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q34: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q35: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q36: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q37: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q38: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q39: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q40: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q41: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q42: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q43: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q44: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q45: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q46: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q47: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q48: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q49: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q50: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q51: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q52: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q53: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q54: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q55: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q56: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q57: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q58: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q59: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q60: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q61: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q62: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q63: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q64: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q65: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q66: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q67: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q68: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q69: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q70: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q71: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q72: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q73: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q74: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q75: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q76: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q77: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q78: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q79: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q80: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q81: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q82: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q83: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q84: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q85: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q86: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q87: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q88: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q89: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q90: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q91: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q92: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q93: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q94: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q95: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q96: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q97: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q98: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q99: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Q100: 0.00 sec, 0.00 sec, 0.000000 MHz
 Total time 8 min, 25 sec



[illegible]

ANNEXE B

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 1h, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1256045.243	628022.621	372.512	<.0001	745.023	1.000
Residual	6	10115.487	1685.914				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 1h, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1064516.390	532258.195	274.499	<.0001	548.998	1.000
Residual	6	11634.104	1939.017				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 24h, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	13564.753	6782.376	138.671	<.0001	277.343	1.000
Residual	6	293.458	48.910				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 24h, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	16855.946	8427.973	42.884	.0003	85.767	1.000
Residual	6	1179.188	196.531				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 2h, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1154308.592	577154.296	2393.574	<.0001	4787.149	1.000
Residual	6	1446.759	241.127				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 2h, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	628046.872	314023.436	520.813	<.0001	1041.630	1.000
Residual	6	3617.679	602.947				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 3h, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1409139.095	704569.547	104.575	<.0001	200.151	1.000
Residual	6	43096.440	7167.740				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 3h, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1230564.630	615282.415	302.381	<.0001	604.762	1.000
Residual	6	12298.746	2034.791				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 48h, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	10766.897	5383.448	41.355	.0003	82.709	1.000
Residual	6	781.067	130.178				

ANOVA Table for adhesion

Split By: Time, %dda

Cell: 48h, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	42039.925	21019.963	278.399	<.0001	556.797	1.000
Residual	6	453.019	75.503				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, %dda
Cell: 4h, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	709341.865	354670.932	726.719	<.0001	1453.436	1.000
Residual	5	2440.221	488.044				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, %dda
Cell: 4h, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1103669.222	551834.611	52.510	.0002	105.020	1.000
Residual	6	63066.246	10511.041				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, %dda
Cell: 8h, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1739004.090	869502.045	149.867	<.0001	299.733	1.000
Residual	6	34611.039	5801.840				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, %dda
Cell: 8h, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
concen	2	1300153.912	650076.956	504.212	<.0001	1006.424	1.000
Residual	6	7735.759	1289.293				

ANOVA Table for adhesion
Split By: concen, %dda
Cell: 1000.000, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Time	6	116.960	19.330	2.694	.0475	17.365	.713
Residual	14	63.505	4.536				

ANOVA Table for adhesion
Split By: concen, %dda
Cell: 1000.000, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Time	6	362.099	60.350	4.783	.0075	26.697	.925
Residual	14	166.412	11.887				

ANOVA Table for adhesion
Split By: concen, %dda
Cell: 1000.000, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Time	6	11963.651	1993.942	7.262	.0011	43.570	.991
Residual	14	3644.166	260.298				

ANOVA Table for adhesion
Split By: concen, %dda
Cell: 1000.000, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Time	6	15016.220	2502.703	2.595	.0664	15.571	.657
Residual	14	13501.300	964.379				

ANOVA Table for adhesion
Split By: concen, %dda
Cell: 100000.000, 91.7

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Time	6	3199724.743	533287.457	77.934	<.0001	467.603	1.000
Residual	13	88956.777	6842.829				

ANOVA Table for adhesion
Split By: concen, %dda
Cell: 100000.000, 95.0

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Time	6	2666660.413	442800.402	71.679	<.0001	431.277	1.000
Residual	14	66207.030	4729.074				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, concen
Cell: 1h, 1000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
%dda	1	6.034	6.034	.738	.4366	.738	.102
Residual	4	43.517	10.879				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, concen
Cell: 1h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
%dda	1	161.263	161.263	.907	.3860	.907	.113
Residual	4	799.613	199.903				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 1h, 100000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	6679.015	6679.015	1.279	.3218	1.279	.140
Residual	4	20908.282	5226.866				

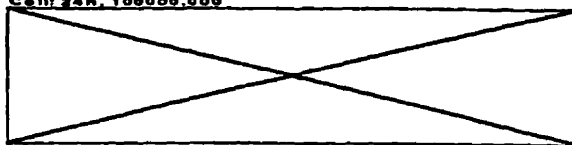
ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 24h, 1000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	8.034	8.034	.219	.6340	.219	.085
Residual	4	148.917	36.854				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 24h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	109.010	109.010	.329	.5697	.329	.073
Residual	4	1339.029	331.807				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 24h, 100000.000



One or more of dependent variables has zero variance.

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 2h, 1000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	9.379	9.379	.920	.4166	.920	.107
Residual	4	27.326	6.806				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 2h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	1357.719	1357.719	4.448	.1029	4.448	.382
Residual	4	1220.819	305.230				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 2h, 100000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	67139.797	67139.797	70.371	.0011	70.371	1.000
Residual	4	3519.293	854.073				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 3h, 1000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	50.211	50.211	10.843	.0301	10.843	.699
Residual	4	18.522	4.631				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 3h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	492.332	492.332	2.922	.1907	2.922	.236
Residual	4	739.211	184.053				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 3h, 100000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dda	1	7432.689	7432.689	.849	.3010	.849	.099
Residual	4	24490.482	13919.113				

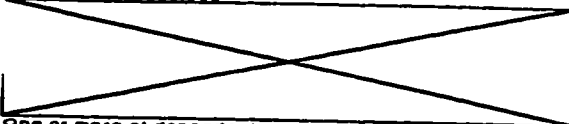
ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 4h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	2.871	2.871	1.280	.3211	1.280	.140
Residual	3	11.138	3.713				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 4h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	7888.372	7888.372	24.712	.0078	24.712	.987
Residual	3	1222.828	407.609				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 4h, 100000.000



One or more of dependent variables has zero variance.

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 4h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	88.343	88.343	12.230	.0248	12.230	.748
Residual	3	22.318	7.439				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 4h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	1448.145	1448.145	.492	.5217	.492	.684
Residual	3	11735.727	3911.909				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 4h, 100000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	2170.038	2170.038	.121	.7308	.121	.057
Residual	3	52728.423	17576.141				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 8h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	88.032	88.032	22.208	.0048	22.208	.988
Residual	3	10.380	3.460				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 8h, 10000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	1109.171	1109.171	18.820	.0188	18.820	.841
Residual	3	282.882	94.294				

ANOVA Table for adhesion
Split By: Time, censored
Cell: 8h, 100000.000

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
% dds	1	21307.730	21307.730	2.017	.2888	2.017	.182
Residual	3	42252.379	14084.126				

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dds, Time
Cell: 91.7, 1h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-54.000	107.524	.3403	
1000.000, 100000.000	-918.098	107.524	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-764.098	107.524	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dds, Time
Cell: 91.7, 24h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-77.335	18.314	<.0001	S
1000.000, 100000.000	9.257	18.314	.3363	
10000.000, 100000.000	86.593	18.314	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dds, Time
Cell: 91.7, 2h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-99.128	40.664	.0007	S
1000.000, 100000.000	-804.405	40.664	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-705.277	40.664	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dds, Time
Cell: 91.7, 3h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-56.700	221.707	.7270	
1000.000, 100000.000	-892.733	221.707	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-836.033	221.707	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dds, Time
Cell: 91.7, 48h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-70.200	29.878	.0009	S
1000.000, 100000.000	5.979	29.878	.8194	
10000.000, 100000.000	78.178	29.878	.0006	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dds, Time
Cell: 91.7, 4h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-123.235	61.361	.0029	S
1000.000, 100000.000	-738.159	68.604	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-614.923	68.604	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dds, Time
Cell: 91.7, 8h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-62.100	199.467	.6305	
1000.000, 100000.000	-961.869	199.467	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-899.869	199.467	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dda, Time
Cell: 95.0, 1h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-40.693	115.313	.5596	
1000.000, 100000.000	-749.055	115.313	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-708.362	115.313	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dda, Time
Cell: 95.0, 24h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-68.135	36.712	.0008	S
1000.000, 100000.000	6.943	36.712	.8365	
10000.000, 100000.000	95.078	36.712	.0005	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dda, Time
Cell: 95.0, 2h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-67.114	64.302	.0424	S
1000.000, 100000.000	-590.913	64.302	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-523.799	64.302	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dda, Time
Cell: 95.0, 3h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-68.650	118.127	.2524	
1000.000, 100000.000	-816.555	118.127	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-747.705	118.127	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dda, Time
Cell: 95.0, 48h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-142.714	22.755	<.0001	S
1000.000, 100000.000	4.436	22.755	.8275	
10000.000, 100000.000	147.150	22.755	<.0001	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dda, Time
Cell: 95.0, 4h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-98.935	268.480	.5337	
1000.000, 100000.000	-787.433	268.480	.0003	S
10000.000, 100000.000	-688.498	268.480	.0005	S

Scheffe for adhesion
Effect: concen
Significance Level: 5 %
Split By: %dda, Time
Cell: 95.0, 8h

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1000.000, 10000.000	-96.822	94.030	.0447	S
1000.000, 100000.000	-850.312	94.030	<.0001	S
10000.000, 100000.000	-753.491	94.030	<.0001	S

Scheffe for adhesion
 Effect: Time^a
 Significance Level: 5 %
 Split By: concen, %dds
 Cell: 1000.000, 91.7

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
1h, 24h	0.000	8.722	.
1h, 2h	-1.929	8.722	.9884
1h, 3h	-1.350	8.722	.9983
1h, 48h	3.279	8.722	.8653
1h, 4h	-2.121	8.722	.9812
1h, 8h	-5.014	8.722	.4968
24h, 2h	-1.929	8.722	.9884
24h, 3h	-1.350	8.722	.9983
24h, 48h	3.279	8.722	.8653
24h, 4h	-2.121	8.722	.9812
24h, 8h	-5.014	8.722	.4968
2h, 3h	.579	8.722	>.9999
2h, 48h	5.207	8.722	.4545
2h, 4h	-.193	8.722	>.9999
2h, 8h	-3.086	8.722	.8944
3h, 48h	4.629	8.722	.5845
3h, 4h	-.771	8.722	>.9999
3h, 8h	-3.664	8.722	.7964
48h, 4h	-5.400	8.722	.4139
48h, 8h	-8.293	8.722	.0680
4h, 8h	-2.893	8.722	.9195

Scheffe for adhesion
 Effect: Time
 Significance Level: 5 %
 Split By: concen, %dds
 Cell: 1000.000, 95.0

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
1h, 24h	4.629	12.315	.8654
1h, 2h	-1.543	12.315	.9995
1h, 3h	-4.821	12.315	.8426
1h, 48h	7.136	12.315	.4880
1h, 4h	6.943	12.315	.5185
1h, 8h	4.829	12.315	.8416
24h, 2h	-6.171	12.315	.6438
24h, 3h	-9.450	12.315	.1992
24h, 48h	2.507	12.315	.9925
24h, 4h	2.314	12.315	.9951
24h, 8h	.201	12.315	>.9999
2h, 3h	-3.279	12.315	.9706
2h, 48h	8.679	12.315	.2768
2h, 4h	8.486	12.315	.2992
2h, 8h	6.372	12.315	.6112
3h, 48h	11.957	12.315	.0600
3h, 4h	11.764	12.315	.0661
3h, 8h	9.651	12.315	.1822
48h, 4h	-.193	12.315	>.9999
48h, 8h	-2.307	12.315	.9952
4h, 8h	-2.114	12.315	.9970

Scheffe for adhesion
 Effect: Time
 Significance Level: 5 %
 Split By: concen, %dda
 Cell: 10000.000, 91.7

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1h, 24h	-23.336	55.926	.8012	
1h, 2h	-47.057	55.926	.1312	
1h, 3h	-4.050	55.926	>.9999	
1h, 48h	-12.921	55.926	.9855	
1h, 4h	-71.357	55.926	.0085	S
1h, 8h	-13.114	55.926	.9843	
24h, 2h	-23.721	55.926	.7894	
24h, 3h	19.286	55.926	.9050	
24h, 48h	10.414	55.926	.9953	
24h, 4h	-48.021	55.926	.1186	
24h, 8h	10.221	55.926	.9958	
2h, 3h	43.007	55.926	.1974	
2h, 48h	34.136	55.926	.4297	
2h, 4h	-24.300	55.926	.7713	
2h, 8h	33.943	55.926	.4361	
3h, 48h	-8.871	55.926	.9981	
3h, 4h	-67.307	55.926	.0136	S
3h, 8h	-9.064	55.926	.9978	
48h, 4h	-58.436	55.926	.0376	S
48h, 8h	-.193	55.926	>.9999	
4h, 8h	58.243	55.926	.0385	S

Scheffe for adhesion
 Effect: Time
 Significance Level: 5 %
 Split By: concen, %dda
 Cell: 10000.000, 91.7

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
1h, 24h	827.355	282.480	<.0001	S
1h, 2h	11.764	282.480	>.9999	
1h, 3h	-75.985	282.480	.9668	
1h, 48h	827.355	282.480	<.0001	S
1h, 4h	77.818	315.822	.9784	
1h, 8h	-148.885	282.480	.5804	
24h, 2h	-815.591	282.480	<.0001	S
24h, 3h	-903.340	282.480	<.0001	S
24h, 48h	0.000	282.480	.	
24h, 4h	-749.537	315.822	<.0001	S
24h, 8h	-976.240	282.480	<.0001	S
2h, 3h	-87.750	282.480	.9357	
2h, 48h	815.591	282.480	<.0001	S
2h, 4h	66.053	315.822	.9906	
2h, 8h	-160.650	282.480	.4979	
3h, 48h	903.340	282.480	<.0001	S
3h, 4h	153.803	315.822	.6609	
3h, 8h	-72.900	282.480	.9728	
48h, 4h	-749.537	315.822	<.0001	S
48h, 8h	-976.240	282.480	<.0001	S
4h, 8h	-226.703	315.822	.2526	

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concen
 Cell: 1h, 1000.000

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concen
 Cell: 1h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	-2.314	7.477	.4386

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	10.993	32.056	.3950

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concen
 Cell: 1h, 100000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	66.728	163.890	.3215

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concen
 Cell: 24h, 1000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	2.314	13.725	.6640

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concen
 Cell: 24h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	-8.486	41.275	.5987

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concen
 Cell: 2h, 1000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	-1.929	5.914	.4165

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concn
 Cell: 2h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	30.086	39.606	.1028

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concn
 Cell: 2h, 100000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	211.564	70.022	.0011 S

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concn
 Cell: 3h, 1000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	-5.786	4.878	.0301 S

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concn
 Cell: 3h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	-17.936	30.755	.1807

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concn
 Cell: 3h, 100000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	70.393	264.517	.5010

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concn
 Cell: 48h, 1000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	1.543	3.786	.3211

Scheffe for adhesion
 Effect: %dda
 Significance Level: 5 %
 Split By: Time, concn
 Cell: 48h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value
91.7, 95.0	-70.971	39.638	.0076 S

Scheffe for adhesion
Effect: %dda
Significance Level: 5 %
Split By: Time, concn
Cell: 4h, 1000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
91.7, 95.0	6.750	5.355	.0249	S

Scheffe for adhesion
Effect: %dda
Significance Level: 5 %
Split By: Time, concn
Cell: 4h, 10000.000

Scheffe for adhesion
Effect: %dda
Significance Level: 5 %
Split By: Time, concn
Cell: 4h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
91.7, 95.0	31.050	122.896	.5217	

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
91.7, 95.0	-42.525	388.787	.7508	

Scheffe for adhesion
Effect: %dda
Significance Level: 5 %
Split By: Time, concn
Cell: 8h, 1000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
91.7, 95.0	7.529	3.683	.0048	S

Scheffe for adhesion
Effect: %dda
Significance Level: 5 %
Split By: Time, concn
Cell: 8h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
91.7, 95.0	-27.193	19.097	.0168	S

Scheffe for adhesion
Effect: %dda
Significance Level: 5 %
Split By: Time, concn
Cell: 8h, 10000.000

	Mean Diff.	Crit. Diff.	P-Value	
91.7, 95.0	119.185	232.991	.2266	