INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

Bell & Howell Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

UMI®

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MODÉLISATION DU COMPORTEMENT VISCOÉLASTIQUE D'ÉQUIVALENTS CUTANÉS CULTIVÉS *IN VITRO*

HUGUES LAFRANCE
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
DÉCEMBRE 1997

©Hugues Lafrance, 1997.

National Library of Canada
Bibliothèque nationale du Canada

Acquisitions and Bibliographic Services
Acquisitions et services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre 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.

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.

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 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.

0-612-47513-1

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

MODÉLISATION DU COMPORTEMENT VISCOÉLASTIQUE D'ÉQUIVALENTS CUTANÉS CULTIVÉS *IN VITRO*

présentée par: LAFRANCE Hugues

en vue de l'obtention du diplôme de: Philosophiae Doctor

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

M. DANSEREAU Jean, Ph.D., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. AUGER François A., M.D., F.R.C.P.(C), membre et codirecteur de recherche

Mme. GERMAIN Lucie, Ph.D., membre

Mme. LABERGE Martine, Ph.D., membre

«On ne traverse pas la vie sans se faire détruire de temps à autres; mais si une trace de lumière persiste, c'est qu'il s'est passé quelque chose de bien.»

Cindy Lou Johnson

À Jean-François

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Élise pour son support dans TOUTES les phases de ces études doctorales. De plus, je remercie grandement mes parents pour tous leurs encouragements.

Je voudrais aussi remercier mon directeur de recherche, le Dr. L'Hocine Yahia, de m'avoir fait confiance dans la réalisation de mes travaux dans un nouveau domaine, soit celui de la peau, au sein du Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux. Je le remercie aussi d'avoir encouragé ma présence à des conférences internationales. Également, je le remercie de m'avoir donné l'opportunité de présenter quelques cours de biomécanique et de biomatériaux au sujet de l'organe cutané.

Je remercie aussi mon codirecteur de recherche, le Dr. François Auger, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe d'ingénierie tissulaire qui compte déjà de nombreux projets originaux. Je le remercie également pour sa confiance qu'il manifeste envers mes idées depuis maintenant neuf ans et ses précieux conseils à la communication scientifique.

Je remercie le Dr. Michel Guillot d'avoir facilité la transition de ce projet du département de génie mécanique de l'Université Laval vers l'École Polytechnique de Montréal.

Au Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale de l'Hôpital du Saint-Sacrement de Québec, je remercie le Dr. Lucie Germain pour son sens critique à l'égard de mes travaux et également, sa confiance à l'égard de mes projets. De plus, je la remercie d'avoir eu la patience de répondre aux nombreuses questions tordues d'un ingénieur. Je remercie le Dr. Francine Goulet pour son assistance à la planification de mes expériences. Un gros merci à Rina Guignard pour TOUT ce qui concerne la production d'équivalents cutanés et sa toujours très généreuse collaboration. Je remercie aussi Claude Marin pour sa précieuse assistance en photographie et sa bonne humeur contagieuse.

Au Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux, je remercie Arnold Mitnitski pour son assistance à la modélisation mathématique, le Dr. Michael Buschmann pour ses recommandations scientifiques, Paule Brodeur pour ses conseils en matière

d'optimisation. Merci aussi aux administrateurs du système informatique, Gildas Perrot et Manuel Fortin.

À l'Université de Montréal, je remercie le Dr. Antonio Nanci de m'avoir alloué du temps pour la réalisation de mes analyses histologiques. Je voudrais aussi remercier le Dr. Jean Dansereau du département de génie mécanique de l'École Polytechnique pour m'avoir donné l'opportunité d'élargir mes connaissances relatives aux plaies de pressions et les sciences touchant la réadaptation. Je remercie Martin Cyr et Claude Turcotte pour ce qui concerne certaines routines de Matlab®. Martin, je te remercie particulièrement pour mon retour au hockey, tes services d'ambulancier ainsi que mon retour et ma retraite du baseball au cours de ces études. Ma reconnaissance va également à Tony Gibbon (special thanks Tony) et à ma grande soeur Annie pour leur aide dans la rédaction de ce document.

Un gros merci aux secrétaires Louise Clément, Diane Giroux et Pierrette Roger.

Je remercie aussi plusieurs ami(e)s de l'institut (ou ancien(ne)s de l'institut) dont Francis Boudreault, Stéphane Dupont, Yves Goussard, Francis Grefford, Pascale Pigeon et Nancy St-Onge pour les très intéressantes discussions (de corridor ou non) que nous avons eues. Même s'ils ne sont pas les meilleurs joueurs de Risk que j'ai connus au LOEX, j'aimerais remercier deux bons amis Martine "l'alsacienne" Michel et Nicolas "salsa piquante" L'Heureux pour leur hospitalité lors de mes visites à Québec.

Du côté de la production de nombreuses diapos, merci à Souad Rhalmi et Maryam Tabrizian.

Finalement, je remercie toutes les personnes formidables que j'ai eu la chance de rencontrer à l'Institut de Génie Biomédical comme au LOEX.

RÉSUMÉ

Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous nous intéressons aux propriétés fonctionnelles mécaniques d'équivalents cutanés ancrés cultivés *in vitro*, un tissu vivant possèdant déjà des propriétés histologiques et des propriétés d'absorption percutanée comparables à la peau normale humaine. Cette application de l'ingénierie tissulaire vise à redonner à un grand brûlé, dans les plus brefs délais, une nouvelle peau fonctionnelle comprenant un épiderme et un derme sous-jacent, sachant que le derme, tel qu'observé *in vivo*, joue un rôle clé dans la fonction mécanique de la peau.

L'état de tension *in vivo* de la peau normale humaine ainsi que la structure fibrillaire de ses composantes, sont les éléments clés qui caractérisent la principale fonction mécanique de la peau normale humaine, soit celle de supporter des tensions multiaxiales. Au chapitre 2, nous avons analysé les différentes méthodologies qui permettent d'évaluer le comportement en tension de la peau et les difficultés inhérentes à obtenir des mesures simples, standardisées et objectives du comportement en tension de la peau normale humaine. D'une part, nous avons mis en évidence que le comportement en tension de la peau normale humaine est défini au moyen de propriétés élastiques, viscoélastiques et plastiques relatives à l'histoire du tissu. D'autre part, l'histoire, la conservation, l'environnement de la peau et la peau elle-même constituent des causes évidentes de variabilité de ces propriétés mécaniques. Dans ce contexte, la compréhension de la relation entre les propriétés mécaniques et la microstructure est indispensable à l'étude de la fonction mécanique de la peau normale humaine.

Dans ce domaine, l'équivalent cutané cultivé *in vitro* présente de nets avantages par rapport à la peau normale humaine. Un grand nombre d'équivalents est généré à partir des mêmes cellules, ces dernières provenant d'une petite biopsie de peau. De plus, les variabilités biologiques observées entre les équivalents cutanés sont beaucoup plus faibles que celles interindividuelles de la peau normale humaine. Pour chacune des étapes de production, de la construction du derme équivalent à la culture de l'épiderme, l'équivalent cutané subit un ensemble de contrôles en vue d'obtenir une microarchitecture cutanée optimale et reproductible. D'ailleurs, l'équivalent cutané deviendra au cours des

prochaines années un modèle cutané désigné pour un nombre considérable d'expériences de pharmacologie, de toxicologie, de cosmétique et de physiologie.

Au quatrième chapitre, nous avons mis au point une nouvelle méthodologie de la mesure des propriétés fonctionnelles mécaniques cutanées répondant aux besoins des équivalents cutanés ancrés cultivés *in vitro*. Il s'agit d'une évaluation utilisant un système mécanique de perforation et conduisant les équivalents cutanés à de grandes distensions. À l'aide de cette méthode, le comportement en tension est déterminé à partir de mesures simples, rapides et précises de force de perforation en fonction de la déflexion d'un poinçon de forme hémisphérique. Suivant ces mesures, nous analysons la résistance mécanique des équivalents en fonction des *maxima* mesurés, et le comportement en tension à l'aide de la relation force-déflexion et à l'aide de l'énergie de perforation calculée.

Dernièrement, un modèle d'équivalent cutané ancré possédant des propriétés histologiques et biologiques comparables à la peau normale humaine, a été développé au Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés. Ce modèle d'équivalent cutané "humain" intègre, en particulier, un derme équivalent qui inclut des collagènes humains de types I et III, de l'élastine et des glycosaminoglycannnes, et sur lequel des kératinocytes ont été ensemencés et cultivés à une interface air-liquide pour constituer un épiderme. Dans le cinquième chapitre, nous discutons des différences de résistance mécanique et du comportement en tension entre ce modèle d'équivalent cutané humain et trois autres modèles d'équivalent cutané différents, en particulier, soit par leur contenu dermique (collagène de type I bovin), ou par l'usage de conditions d'immersion pour la culture de l'épiderme. Ce travail a d'abord démontré que la résistance mécanique de l'équivalent cutané humain cultivé à une interface air-liquide constitue un *optimum* qui devance largement les autres modèles. Selon les analyses histologiques de ces équivalents cutanés humains, cette résistance mécanique est imputable à une meilleure qualité structurale du *stratum corneum*. Par la suite, nous avons démontré que le comportement en tension de tous les modèles d'équivalent cutané possèdent un comportement à trois phases où la rigidité des composantes, celle des fibrilles de collagène du derme équivalent et celle des filaments de kératine de l'épiderme, se manifeste dans la dernière phase de distension. Cependant, chez les équivalents cutanés humains cultivés *in vitro* à une interface air-liquide, la rigidité des fibrilles de collagène du derme équivalent n'est pas exprimée comme chez les équivalents cutanés cultivés en immersion.

Au chapitre 6, nous avons élaboré un protocole afin de démontrer l'évolution du comportement en tension d'équivalents cutanés humains cultivés en immersion, en fonction du nombre de cycles (charge/décharge) et en fonction du temps d'application de la distension. Dans cette évolution, nous avons observé l'apparition de charge résiduelle, de dissipation d'énergie et de relaxation de charge. Ce résultat est important puisque l'évolution des propriétés mécaniques démontre que de discuter d'élasticité pure au sujet d'un équivalent cutané est quelque peu abusif. Dans cette évolution, nous considérons l'apparition d'une certaine somme de microdommages, imperceptibles à l'oeil et au toucher. Cette considération est importante puisqu'elle démontre la nécessité de contrôler les chargements mécaniques appliqués aux équivalents cutanés.

Pour comprendre les liens entre les propriétés mécaniques du comportement en tension et les composantes des équivalents cutanés, nous avons défini une fonction objective minimisant l'erreur quadratique entre l'énergie nécessaire à la perforation que nous avons mesurée, et l'énergie emmagasinée dans l'équivalent prédite par un modèle structurel (équation 18, chapitre 7). Ce modèle structurel développé par Lanir intègre plusieurs quantités physiques, tels que les types de protéines, la fraction volumique, l'élasticité, la forme et la distribution de fibrilles protéiques. Suivant cette fonction, la solution obtenue dépend de la précision de nos mesures de perforation et du modèle structurel.

En utilisant des valeurs d'élasticité des fibrilles protéiques définies par des expériences microstructurales *in vitro* et nos analyses histologiques des équivalents cutanés, nous démontrons qu'il est possible, à l'aide de notre fonction objective, de comparer la forme des fibrilles de collagène humain avec celle des fibrilles de collagène bovin. De plus, en connaissant la forme des fibrilles de collagène, nous pouvons estimer la distribution de ces fibrilles dans un derme équivalent humain. Du côté épidermique, nous montrons qu'il est possible d'estimer la forme des filaments de kératine ainsi que leur fraction volumique au niveau des couches suprabasales. En utilisant l'évolution du comportement en tension d'équivalents cutanés humains cultivés en immersion en fonction du nombre de cycles, nous pouvons minimiser la fonction objective en faisant décroître la fraction volumique des kératines avec le nombre de cycles. En nous appuyant sur ces derniers résultats, nous considérons que l'évolution du comportement en tension est associée à une accumulation de microdommages du réseau protéique mieux connue sous le nom de *strain softening*.

Jusqu'ici, nous avons démontré que l'étude de l'évolution des propriétés fonctionnelles mécaniques des équivalents cutanés cultivés *in vitro* à l'aide d'un modèle structurel constitue une méthode objective pour des buts expérimentaux. Finalement, nous pensons que l'optimisation de la fonction mécanique des équivalent cutanés pour les soins des grands brûlés ou d'autres pathologies, doit se poursuivre selon cette approche structurelle. Nous croyons également que cette méthodologie peut nous aider à déterminer des mécanismes d'adaptation cutanée qui seraient utiles à plusieurs traitements cliniques.

ABSTRACT

In this doctoral thesis, we are interested in the functional mechanical properties of anchored skin equivalents cultured *in vitro*. These bioengineered skins possess comparable histological and biological properties to normal human skin. The production of skin equivalents aims to give burn victims, as quickly as possible, a new functional skin which consists of a cultured epidermis upon a dermal equivalent, with the understanding that the dermal layer has a key role in the mechanical function of skin *in vivo*.

In normal human skin, the *in vivo* tensile state and the fibrillar structure of components are the most important features which suggest that the main mechanical function of skin is to bear multiaxial tensions. In chapter two, we analyze different methodologies which allow the evaluations of the tensile behavior of skin, and we discuss the difficulties related to the simple, normalized and objective measurements describing the tensile behavior of normal human skin. On one hand, our investigations highlight that the tensile behavior of normal human skin is described by elastic, viscoelastic and plastic properties. On the other hand, the history, the preservation methods, the skin environment and the skin itself are obvious causes of variability in the measured mechanical properties.

The skin equivalent cultured *in vitro* present marked advantages over normal human skin. Numerous equivalents may be produced from a group of cells harvested from a small skin biopsy. In addition, the biological variances observed between skin equivalents are smaller than those for normal human skin. During each step of production, from the culture of the dermal equivalent up to the cultured epidermis, the skin equivalents are subjected to controls in order to obtain an optimal and repeatable cutaneous microarchitecture. In the near future, the skin equivalents will be a designated cutaneous model for numerous pharmacological, toxicological, cosmetological and physiological experiments.

In chapter four, we develop a new methodology for the measurements of functional mechanical cutaneous properties tailored to the needs of anchored skin equivalents cultured *in vitro*. We use a method involving a mechanical system for indentation and

large stretching of the skin equivalents. With the help of this new method, the tensile behavior is defined from simple, quick and accurate measurements by following the indentation load as a function of the deflection of a hemispherical indenter. With these measurements, we analyze the mechanical strength of skin equivalents using the measured *maxima*, and their tensile behavior with the indentation load-deflection relationship and the calculated energy needed for the indentation.

Recently, a skin equivalent model showing comparable histological and biological properties to normal human skin has been developed at the Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés of Quebec city. This "human" skin equivalent model consists of a dermal equivalent which includes human types I+III collagens, elastin and glycosaminoglycans, and an epithelium composed of keratinocytes seeded upon the dermal equivalent and cultured at an air-liquid interface. In chapter five, we establish comparisons of tensile strength and tensile behavior between this skin equivalent model and three other models which differ in their collagen content (bovine type I collagen) or in the conditions of immersion for the epidermal culture. This work demonstrates that the tensile strength of the human skin equivalent cultured at an air-liquid interface is higher than that of the three other models. According to the histological findings, the tensile strength is attributable to a better structural quality of the *stratum corneum*. We also demonstrate that the tensile behavior of all models shows a three-phase behavior where the stiffness of collagen fibrils within the dermal equivalent and the stiffness of keratin filaments within the cultured epidermis are observed in the last stretching phase. However, while human skin equivalents cultured *in vitro* under submerged conditions demonstrate the stiffness of the collagen fibrils, this stiffness disappears when the same skin equivalent are cultured at an air-liquid interface.

In chapter six, we establish a protocol to study the evolution of tensile behavior of human skin equivalents cultured in a submerged condition as a function of the number of loading-unloading cycles and the stretch duration. In these experiments, we observed a residual loading, energy dissipation and a load relaxation. These results are important since the changes in mechanical properties show that the use of pure elasticity for skin equivalents may not be feasible. We feel that these results are explained by the strong probability that there exist microruptures imperceptible to the eye and hand. This

consideration is noteworthy since it underlines the need for the careful control of handling and loading of skin equivalents.

In order to understand the relationship between the mechanical properties of the tensile behavior and the components of skin equivalents, we have developed an objective function which minimizes the quadratic error between the required energy for the measured indentation, and the stored energy within the indented skin equivalent predicted by a structural model (equation 18, chapter 7). This function uses a model developed by Lanir which can incorporate several physical quantities such as the type of fibrillar protein, the volume fraction and the elasticity, shape and distribution of protein fibrils. The results obtained based on this objective function were dependent of the accuracy of our indentation measurements and of the structural model.

Using the elastic modulus values of protein fibrils derived from microstructural experiments *in vitro* and our histological findings of skin equivalents, we show that our objective function allows us to compare the waviness of human collagen fibrils with bovine collagen fibrils. With knowledge of the waviness of collagen fibrils, we can predict their distribution in a human dermal equivalent. For the epidermis, we can estimate the waviness of the keratin filaments and their volume fraction at the level of suprabasal layers. Using the characteristics of the tensile behavior of human skin equivalents cultured under the submerged condition as a function of the number of loading cycles, we can minimize the objective function by reducing the keratin filament volume fraction. These final results can explain that the changes under tension are related to a build-up of microdamages to the protein network, probably best explained by a *strain-softening* phenomenon.

The study using the objective function and its included structural model holds considerable promise for future experimental purposes. We believe that using a structural approach will allow the development of the best possible functional mechanical properties for skin equivalents for the care of severe burn victims and chronic pathologies. We also believe that this methodology will encourage advances in *skin adaptation* methods for caregivers involved in different clinical treatments.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE iv
REMERCIEMENTS v
RÉSUMÉ vii
ABSTRACT xi
TABLE DES MATIÈRES xiv
LISTE DES TABLEAUX xix
LISTE DES FIGURES xxi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xxvi
LISTE DES PHOTOGRAPHIES xxix

CHAPITRE I : INTRODUCTION 1
1.1 Fondement, but et hypothèses 1
1.2 Objectifs de la thèse 2
1.3 Physiologie de l'organe cutané 3
1.3.1 Généralités 4
1.3.2 Structure de la peau 4
1.3.3 Fonction mécanique de la peau 6
1.4 La reconstruction de la peau: l'essor de l'ingénierie tissulaire 8
1.4.1 Le problème de l'organe manquant 8
1.4.2 L'équivalent cutané cultivé *in vitro* : une approche par ingénierie tissualire 11

CHAPITRE II : REVUE CRITIQUE DE LITTÉRATURE 14
2.1 La biomécanique cutanée: les composantes et leurs rôles 14
2.1.1 Le gel dermique 14
2.1.2 Le collagène 18
2.1.2.1 Structure de la molécule de collagène de type I 19
2.1.2.2 Assemblage du collagène de type I 20
2.1.2.3 Fibrillogénèse *in vitro* du collagène de type I 23
2.1.2.4 Interactions fibroblastes-fibrilles de collagène de type I 26

2.1.2.5 Propriétés mécaniques des molécules de collagène de type I 29
2.1.2.6 Propriétés mécaniques des fibrilles de collagène de type I 31
2.1.2.7 Propriétés mécaniques dermiques 32
2.1.2.8 Le collagène de type III 34
2.1.3 L'élastine 35
2.1.4 Les protéo- et glycosaminoglycannes, et glycoprotéines 38
2.1.5 Le *stratum corneum* 42
2.2 Méthodes de mesure des propriétés biomécaniques de la peau 49
2.2.1 Méthodes d'évaluation *in vivo* 50
2.2.2 Méthodes d'évaluation *in vitro* 53
2.2.3 Autres méthodologies 57
2.2.4 Les limites des techniques de mesure 59
2.3 La mécanique de la peau soumise à des états de tension 62
2.3.1 Représentations théoriques des mesures des propriétés mécaniques de la peau 62
2.3.2 Les relations contraintes *versus* déformations 65
2.3.3 L'hystérésis 67
2.3.4 Le taux de déformation 67
2.3.5 Relaxation et le fluage 67
2.3.6 La réponse cutanée aux *stimuli* dynamiques: oscillations sinusoïdales 69
2.3.7 Le préconditionnement 72
2.3.8 La plasticité 73
2.4 Modélisation des propriétés biomécaniques cutanées 75
2.4.1 Modèles phénoménologiques 75
2.4.2 Les modèles de *continua* mécaniques 77
2.4.3 Modèles structurels 79

CHAPITRE III : SYNTHÈSE 89

CHAPITRE IV : ARTICLE 1 — *Method for the Evalution of Tensile Properties of Skin Equivalents* 106
4.1 Abstract 107
4.2 Introduction 108
4.3 Overview of the method 110
4.4 Design of the mechanical system 110
4.4.1 The indentation apparatus 110
4.4.2 Data acquisition system 112
4.4.3 Culture dish 113
4.5 Experimental technique 114
4.5.1 Anchored dermal equivalents preparation 114
4.5.2 Measurements 115
4.6 Results 116
4.6.1 Evaluation of the method, measuring techniques and apparatus 116
4.6.2 Effects of culture parameters 119
4.7 Discussion and conclusions 121

CHAPITRE V : ARTICLE 2 — *Study of the Tensile Properties of Living Skin Equivalents* 124
5.1 Abstract 125
5.2 Introduction 126
5.3 Materials and methods 128
5.3.1 Human cutaneous cell cultures 129
5.3.2 Dermal equivalent préparations 129
5.3.3 Living skin equivalent préparations 131
5.3.4 Biomechanical testing 132
5.3.5 Statistical analysis 134
5.3.6 Histology 135
5.4 Results 135
5.4.1 Biomechanical properties 135
5.4.2 Maximum load and deflection at break points 139
5.4.3 Energy needed for maximum load 139
5.4.4 Histological analysis 140
5.5 Discussion 142

5.6 Conclusions 145

CHAPITRE VI : ARTICLE 3 — *Mechanical Properties of the Human Skin Equivalents Submitted to Cyclic Tensile Forces* 146

6.1 Abstract 147

6.2 Introduction 148

6.3 Material and methods 149

6.3.1 Preparation of human cutaneous cell cultures 140

6.3.2 Preparation of the disk-shaped Dermal equivalents 150

6.3.3 Preparation of skin equivalents 150

6.3.4 Biomechanical testing 151

6.4 Results 154

6.4.1 Indentation load *versus* ramp—Δ cycle 154

6.4.2 Energy losses and residual loading 158

6.4.3 Hysteresis 159

6.4.4 Relaxation 161

6.4.4 Short-duration pause effects 163

6.5 Discussion 164

CHAPITRE VII : ARTICLE 4 — *Application of Lanir's Structural Model to Tissue Engineered Skin* 166

7.1 Abstract 167

7.2 Introduction 167

7.3 Formulation of the problem 170

7.3.1 Histological findings of anchored disk-shaped skin equivalent 170

7.3.2 Basic assumptions 172

7.3.3 Fibril and filament mechanics 175

7.3.4 Collagen fibril's distribution and volume fractions 176

7.3.5 Kinematics of fibrils and filaments 177

7.3.6 General problem 179

7.4 Estimation method 180

7.5 Results 181

7.6 Discussion 187

7.7 Appendix I 190

CHAPITRE VIII : CONCLUSION 191

BIBLIOGRAPHIE 197

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Estimation produite par Marieb et Laurendeau (1993) de la quantité d'annexes cutanés et de réseaux dermiques inclus dans une biopsie de 1 cm^2 de peau 6

Tableau 2.1: Proportion des principales macromolécules de différents tissus, en pourcentage de tissu déshydraté (% par PTDH), d'après Grant et Prockop (1972) 15

Tableau 2.2: Les types de collagène de la peau (Burgeson, 1982; Millington et Wilkinson, 1983; Uitto et Eisen, 1987; Wenstrup *et al.*, 1991; Berthod *et al.*, 1997) 18

Tableau 2.3: Diamètre des fibrilles de collagène de type I *in vivo* 21

Tableau 2.4: Diamètre des fibrilles de collagène de type I reconstituées *in vitro* à 37°C 24

Tableau 2.5: Mesures du taux d'élasticité normalisé de la molécule de collagène de type I 30

Tableau 2.6: Mesures du taux d'élasticité normalisé de l'élastine 38

Tableau 2.7: Caractéristiques physiques des protéo- et glycosaminoglycannes (PGs, GAGs) du derme et de la membrane basale 40

Tableau 2.8: Tests de traction uniaxiale réalisés *in vivo* sur de la peau humaine 51

Tableau 2.9: Tests de succion réalisés *in vivo* sur de la peau humaine 52

Tableau 2.10: Tests de torsion réalisés *in vivo* sur de la peau humaine 53

Tableau 2.11: Tests de traction uniaxiale réalisés *in vitro* sur de la peau 54

Tableau 2.12: Tests de traction biaxiale réalisés *in vitro* sur des tissus mous membranaire 56

Tableau 2.13: Tests d'évaluation biomécanique de la peau moins répandus..... 58

Tableau 2.14: Modèles de *continua* mécaniques développés pour la peau 78

Tableau 2.15: Sommaire des caractéristiques matérielles du modèle structurel de Lanir 88

Tableau 5.1: Volumetric composition of bDE..... 130

Tableau 5.2: Volumetric composition of hDE..... 131

Tableau 5.3: The tensile properties of six groups of cultured cutaneous tissues: Two dermal equivalents (bDE, hDE+), two living skin equivalents cultured in immersion (bSE_i, $hSE+_i$) and two living skin equivalents cultured at air-liquid interface (bSE_{al}, $hSE+_{al}$)..... 136

Tableau 6.1: Informations of the Δ- mm deflection stimuli used in the ramp-Δ cycles 152

Tableau 6.2: Energy loss following the first preconditionning cycle ($W_{loss\text{-}p1}$) for CG, DE and SE..... 159

Tableau 7.1: Estimated constrained S_3^0-, μ_{R3}- and SD_{R3}-variables of anchored human or bovine skin equivalents cultured in immersion or at an air-liquid interface 185

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Schéma d'une vue tridimensionnelle de l'organe cutané (tiré de Marieb et Laurendeau, 1993) 5

Figure 1.2: Représentation schématique des forces interagissant aux points de contact du corps humain (Matlhoko, 1994) 8

Figure 2.1: Représentation schématique des composantes du derme (Silver, 1987) 14

Figure 2.2: Représentation schématique de la transition sol-gel d'aprés Vollmert (1973) 17

Figure 2.3: Représentation schématique de l'assemblage du collagène type I d'après Kadler (1974), Montagna et Parakkal (1974), Uitto et Eisen (1987) 22

Figure 2.4: Représentation schématique d'une distribution randomisée de fibrilles de collagène à l'intérieur de gels produits *in vitro*, d'après les observations de Allen *et al.* (1984) et Lapière *et al.* (1988) 26

Figure 2.5: Représentation schématique bidimensionnelle des rotations que subissent les fibrilles de collagène du derme 32

Figure 2.6: Représentation schématique de l'organisation des molécules d'élastine du derme (Alberts *et al.*, 1995) 36

Figure 2.7: Représentation schématique des volumes relatifs de diverses molécules dont le collagène de type I et une molécule hydratée d'acide hyaluronique (Alberts *et al.*, 1995) 39

Figure 2.8: Représentation schématique de la vue en coupe de l'épiderme (Alberts *et al.*, 1995) 43

Figure 2.9: Représentation schématique d'un desmosome ponctuel (Alberts *et al.*, 1995) 44

Figure 2.10: Représentation schématique de la vue en coupe d'un kératinocyte de la couche épineuse de l'épiderme (Alberts *et al.*, 1995) 46

Figure 2.11: Courbes de force *versus* allongement du *stratum corneum* (Wildnauer *et al.*, 1971) 48

Figure 2.12: Courbe typique normalisée de contraintes *versus* déformations de la peau 66

Figure 2.13: Courbes typiques normalisées de relaxation de contrainte et de fluage de la peau 69

Figure 2.14: Courbes typiques des oscillations harmoniques servant à caractériser un comportement viscoélastique quasi-linéaire 72

Figure 2.15: Modèle phénoménologique proposé par Fung (1972) pour les tissus mous 76

Figure 2.16: Représentation schématique des réseaux de collagène et d'élastine des tissus membranaires telle que proposée par Lanir (1979) 83

Figure 4.1: Schematic diagram of the method for the evaluation of tensile properties of skin equivalent (SE) 111

Figure 4.2: Diagram of a split front-view of the culture dish with anchored dermal equivalent (ADE) 113

Figure 4.3: Effect of culture period on the central load-deflection curve of disc-shaped anchored dermal equivalents at initial dermal fibroblast concentration of 0.25 X 10^6 cells/ml. 117

Figure 4.4: Effect of initial dermal fibroblast concentration on the central load-deflection curve of disc-shaped anchored dermal equivalents at a culture period of 2 days 118

Figure 4.5: Evolution of central load of rupture (a), rupture deflection (b) and high modulus (c) of anchored dermal equivalents versus culture periods (1, 2, 4, 7 days) and initial dermal fibroblast concentrations: 0.25 X 10^6 cells/ml; 0.5 X 10^6 cells/ml; 1.5 X 10^6 cells/ml 120

Figure 5.1: Schematic cross-section representation of a cultured cutaneous tissue during indentation 133

Figure 5.2: Schematic description of biomechanical properties for cutaneous equivalents 135

Figure 5.3: Typical curves of the spherical indentation load-central deflection relationship for cutaneous equivalents produced with bovine collagen and cultured 21 days 137

Figure 5.4: Typical curves of the spherical indentation load-central deflection relationship for cutaneous equivalents produced with human collagens and cultured 23 days 138

Figure 5.5: The figure shows the energy needed to reach the point of maximum load during a spherical indentation test as a function of cultured cutaneous tissues 140

Figure 6.1: Sequence of ramp-Δ cycles (p1:p10; c1:c10; Relaxation) for the experimental loading protocol 151

Figure 6.2: Schematic description of indentation readings: load (P) *versus* central deflection (Δ) on disk-shaped specimen submitted to a ramp-deflection cycle 153

Figure 6.3: Typical curves of indentation load (P) readings during ramp-deflection cycle (Δ) for (a) CG, (b) DE and (c) SE 155

Figure 6.4: Scatterplot of Residual indentation load (P_{res}) after ramp-deflection cycles for CG, DE and SC-like 158

Figure 6.5: Scatterplot of hysteresis value (H) for each ramp-deflection cycle: (a) CG, (b) DE and (c) SC-like..... 159

Figure 6.6: Scatterplot of maximum indentation load (P_{max}) reached during each ramp-deflection cycle: (a) CG, (b) DE and (c) SC-like 161

Figure 6.7: Typical relaxation curves for CG, DE and SC-like, following cycles after a 5-minutes pause 163

Figure 7.1: Typical indentation curve of a human disk-shaped dermal equivalent (containing fibroblasts, human type I+III collagens, elastin and GAGs): axial force (P) required to produce the deflections (Δ) (from Lafrance et al., 1995b)..... 169

Figure 7.2: Schematic view of the ϕ-angle ($-\pi/2 \leq \phi \leq \pi/2$) of fibrils/filaments around the curvilinear ξ_1 -axis of a flat tissue equivalent 174

Figure 7.3: Schematic cross-sectional view of the θ-axisymetric middle surface of disk-shaped tissue equivalent under a deformed configuration 177

Figure 7.4: Estimated constrained μ_{R2}- and SD_{R2}-variables of anchored human (type I+III collagens, elastin and GAGs) and bovine type I collagen gels 182

Figure 7.5: Estimated constrained $l_{\phi 2}$-, $\mu_{\phi 2}$- and $SD_{\phi 2}$-variables of anchored human dermal equivalents (fibroblasts, type I+III collagens, elastin and GAGs) 183

Figure 7.6: Estimated constrained S_3^0-variable of anchored skin equivalents cultured in immersion following their second loading cycle and their twentieth loading cycle 186

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

(R, Θ, Z) :	coordonnées cylindriques polaires d'un point dans la configuration non-déformée d'un tissue de culture cutanée.
(r, θ, z) :	coordonnées cylindriques polaires d'un point dans la configuration déformée de la surface moyenne d'un tissue de culture cutanée.
(ξ_1, ξ_2) :	coordonnnées curvilignes (orientation parallèle, méridienne) d'un point de la surface moyenne d'un tissu de culture cutanée.
+ :	fait référence à des suppléments d'élastine et de GAGs si ajouté à CG, DE ou SE.
A :	surface d'un équivalent cutané ancré.
al :	fait référence à des conditions de culture air-liquide si ajouté à SE.
B :	rayon d'un équivalent cutané ancré.
b :	fait référence à du collagène humain de type I si ajouté à CG, DE ou SE.
c_2^{final} :	concentration finale de collagène de la préparation du derme équivalent.
c1 :	cycle de charge/décharge suivant le préconditionnement.
CÉ :	culture d'épiderme.
CG (ou C) :	*collagen gel.*
Δ :	déflexion centrale du tissu déformé par perforation.
Δ_{break} :	déflexion centrale à la rupture.
Δ_c :	déflexion centrale mimimum d'un cycle suivant le préconditionnement.
Δ_{max} :	déflexion centrale à P_{max}.
$\overline{\Delta}_{max}$:	déflexion centrale moyenne à P_{max}.
Δ_p :	déflexion centrale minimum d'un cycle de préconditionnement.
Δ_u :	déflexion centrale maximum d'un cycle de charge.
δ_i :	erreur maximum absolue.
$D_k(\phi)$:	fonction bimodale gaussienne de densité de probablilité angulaire selon l'angle ϕ.
DE, DÉ :	*dermal equivalent* ; derme équivalent cultivé *in vitro* .
DMEM :	*Dulbecco-Vogt Modification of Eagles's Medium.*

E :	tenseur de déformation de Green-Lagrange ou Green et Saint-Venant.
ÉC :	équivalent(s) cutané(s)
EGF :	*epidermal growth factor.*
ϕ :	angle d'une fibrille ou filament dans le plan du tissu.
FPMA :	*fibroblast-populated microsphere assay.*
GAGs :	glycosaminoglycannes.
G_{ij}, g_{ij} :	tenseurs métriques.
h_0 :	épaisseur initiale du tissu.
H :	hystérésis d'un cycle de charge/décharge de perforation.
h :	fait référence à du collagène humain de types I+III si ajouté à CG, DE ou SE.
HDCL :	*high density cross-links.*
i :	fait référence à des conditions de culture d'immersion si ajouté à SE.
$I_{\phi k}$:	intensité angulaire d'une fonction bimodale gaussienne $D_k(\phi)$.
k :	type de réseau fibrillaire.
K_k :	module de rigidité linéaire d'un type de fibrille ou filament.
λ_1 :	rapport d'allongement selon la direction parallèle ξ_1.
λ_2 :	rapport d'allongement selon la direction méridienne ξ_2.
λ_f :	rapport d'allongement d'une fibrille ou filament.
LDCL :	*low density cross-links.*
LGRB :	Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés.
LOEX :	Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale.
$\mu_{\phi k}$:	angle moyen d'une fonction bimodale gaussienne $D_k(\phi)$.
μ_{Rk} :	rapport d'allongement moyen d'une fonction gaussienne $R_k(\lambda_f)$.
P :	force de perforation appliquée à un tissu de culture cutanée.
P_{break} :	force de perforation à la rupture.
P_{max} :	force de perforation maximum.
P_{res} :	force de perforation résiduelle.
P_{up} :	force de perforation maximum d'un cycle de charge/décharge.
PSV_2 :	volume spécifique partiel du collagène de type I.

p1 :	cycle de préconditionnement.
PGs :	protéoglycannes.
PTDH :	poids de tissu déshydraté.
R.H. :	*relative humidity.*
$R_k(\lambda_f)$:	fonction gaussienne de densité de probablilité de recrutement des fibrilles ou filaments selon le rapport d'allongement λ_f.
S_k^0 :	fraction volumique initiale occupée par un type de fibrille ou filament.
SC, SC-like :	*stratum corneum* , structure ressemblant à un *stratum corneum* cultivés *in vitro.*
$SD_{\phi k}$:	déviation standard d'une fonction bimodale gaussienne $D_k(\phi)$.
SD_{Rk} :	déviation standard d'une fonction gaussienne $R_k(\lambda_f)$.
SE :	*skin equivalent* .
u :	vecteur de variables contraintes.
$V_2^{initial}$:	volume initiale de la préparation de DÉ.
VDA :	*video-dimension analyzer.*
VQL :	viscoélasticité quasi-linéaire.
W:	quantité d'énergie nécessaire à la perforation d'un équivalent cutané.
$\bar{W}_t$:	densité d'énergie de déformation du tissu.
W_f :	fonction d'énergie de déformation total du réseau fibrillaire d'un tissu.
W_{stored} :	énergie emmagasinée par les composantes structurales du tissu.
W_Ψ :	énergie osmotique de tout le tissu.
w_k :	énergie de déformation uniaxiale enmagasinée dans une fibrille ou filament.
x_i :	équations paramétriques de la surface moyenne d'un équivalent cutané dans une configuration non-déformée.
y_i :	équations paramétriques de la surface moyenne d'un équivalent cutané dans une configuration déformée.
$f(\mathbf{u})$:	fonction objective de plusieurs variables contraintes d'une estimation par les moindres carrés.
≈ :	fait référence à des changements moins fréquents de milieu de culture si ajouté à DE

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 4.1: Photographs of the indentation apparatus for tensile properties evaluation of skin equivalents 112

Photographie 4.2: Macroscopical view of anchored dermal equivalent rupture during indentation assay 119

Photographie 5.1: Hematoxylin, phloxine and saffron staining showing histological views of full thickness of cultured cutaneous tissues 141

Photographie 5.2: Hematoxylin, phloxine and saffron staining showing histological views of full thickness of living skin equivalents cultured in immersion (bSE_i; $hSE+_i$) and stretched up to 75% of respective P_{max}..... 142

Photographie 7.1: Light micrograph of a human skin equivalent (SE) cultured *in vitro* 170

Photographie 7.2: Photography of a SE (a whitish tissue) under a deformed configuration (Δ = 13.166 mm)..... 181

CHAPITRE I
INTRODUCTION

La modélisation du comportement viscoélastique d'équivalents cutanés cultivés *in vitro* (ÉC) apparaît de prime abord comme un sujet hautement spécialisé. Ce comportement visqueux et élastique de l'ensemble des tissus mous permet à notre corps de répondre à un ensemble de fonctions mécaniques. Ce comportement représente aussi un véritable défi dans sa compréhension lorsqu'il s'agit de reconstruire un tissu pratiquement identique à celui perdu. À la lumière de mes réflexions tout au long de cette thèse, ce sujet peut porter l'attribut de "spécialisé" mais demeure sans aucun doute une avenue fascinante et incontournable pour le bénéfice de ceux qui feront usage d'ÉC (greffé(e)s, chirurgiens(ennes), chercheur(e)s).

1.1 Fondement, but et hypothèses

Le fondement de la recherche présentée dans cette thèse est la capacité de reproduire un tissu cutané *in vitro*. Au cours des dernières années, l'ingénierie tissulaire a conduit à la production d'ÉC pour des objectifs cliniques et expérimentaux. Cependant, dans l'application clinique et la production même de ces ÉC, il existe encore plusieurs questionnements entourant la fonction mécanique de ces tissus. En particulier, de quelle façon peut-on caractériser et optimiser les propriétés mécaniques fonctionnelles de ces ÉC? De plus, le contrôle de qualité de ces propriétés devient incontournable dans un cadre de production d'ÉC.

Le but poursuivi dans cette thèse est donc de procéder à une analyse fonctionnelle des ÉC sur le plan de la mécanique. Ceci inclut le développement de méthodes et l'évaluation de propriétés mécaniques permettant de discuter objectivement de la mécanique des ÉC.

Cette analyse s'inscrit dans un plan d'optimisation de modèles d'ÉC développés au LRGB/LOEX. Les ÉC visés par cette étude possèdent les particularités d'être des tissus à la fois "humains" et "biologiques". Ces dernières particularités constituent aussi des

convictions scientifiques du LRGB/LOEX dans le but de réaliser des équivalents tissulaires *optimums*.

Ma principale contribution dans cette thèse se situe surtout au niveau du développement de méthodologies permettant d'évaluer des propriétés fonctionnelles mécaniques des ÉC et d'optimiser ces propriétés en fonction de la microstructure des ÉC. Avec cette meilleure connaissance mécanique des ÉC, il sera possible d'établir des conditions de culture optimale et donc, de produire une peau de remplacement «idéale».

Les hypothèses relatives à ce travail de recherche se décrivent comme suit:
— La mesure de propriétés mécaniques fonctionnelles et objectives est assurée par la minimisation des manipulations des ÉC et l'utilisation de grandes distensions des ÉC.
— L'endommagement des ÉC lors de distensions répétées peut jouer un rôle déterminant dans l'accomplissement de la fonction mécanique de ces tissus.
— L'utilisation de collagènes humains et la condition de culture à une interface air-liquide dans la production d'un ÉC influencent les propriétés mécaniques fonctionnelles de ce tissu.
— Les ÉC sont considérés comme des tissus membranaires hyperélastiques et l'utilisation de l'énergie de déformation est nécessaire à la description des déformations finies que subissent les ÉC.
— L'utilisation d'un modèle structurel doté d'un sens physique est beaucoup plus adaptée que les formulations pseudoélastiques pour décrire et prédire le comportement mécanique d'un tissu reconstruit et pour optimiser ses propriétés mécaniques fonctionnelles. Le modèle structurel permet un meilleur dialogue entre l'expérience et la modélisation.

1.2 Objectifs de la thèse

Les objectifs de la thèse se décrivent comme suit:
● Comprendre les fonctions mécaniques de la peau humaine et de chacune de ses composantes microstructurales dans un contexte *in vivo*. Démontrer ce rôle majeur que joue la fonction mécanique de la peau *in vivo* et dans un contexte d'ingénierie tissulaire.
● Sur la base des fonctions mécaniques essentielles à la peau, élaborer une méthode de mesure objective de propriétés mécaniques fonctionnelles des ÉC .

● Évaluer des propriétés mécaniques associées à la résistance, l'élasticité et la plasticité des ÉC.

● Modéliser de façon objective la mécanique des ÉC. Ce modèle vise à assister le développement d'un ÉC "mécaniquement" fonctionnel à l'intérieur d'un groupe de travail multidisciplinaire. Également, ce modèle vise à faciliter les interactions entre les différentes disciplines nécessaires au sein d'un groupe d'ingénierie tissulaire.

● Acquérir une somme de connaissances tant en ingénierie qu'en sciences de la santé afin de tisser des liens entre les différents intervenants en ingénierie tissulaire dont le succès passe inexorablement par l'intégration de plusieurs disciplines, et notamment l'ingénierie, dans leurs travaux de recherche

Cette thèse renferme des notions que l'on retrouve en parcourant une variété de sciences: *e.g.* la mécanique, la culture cellulaire, la physiologie, les mathématiques, l'informatique, la biochimie pour ne nommer que celles-là. Pour l'ingénieur, la lecture de cette thèse est une rencontre avec le vivant infiniment complexe et surprenant. Pour le clinicien, cette thèse lui procurera, je l'espère, une visibilité plus nette au sein de l'innovation technologique touchant ce domaine. C'est d'ailleurs, le propre d'un ingénieur se spécialisant en génie biomédical d'acquérir une polyvalence qui lui permettra d'appliquer les sciences de l'ingénierie au milieu de la santé.

1.3 Physiologie de l'organe cutané

La peau qui constitue la plus grosse partie du système tégumentaire[1], révèle une physiologie extrêmement complexe pour quiconque l'étudie. Les mérites de cet organe dépassent ceux de toutes les couvertures auxquelles il vous a été donné de profiter au cours de votre vie. D'ailleurs, Marieb et Laurendeau (1992) décrivent la peau comme étant imperméable, élastique, infroissable, réparant automatiquement ses petites coupures, déchirures et brûlures grâce à d'invisibles outils de raccommodage, et garantie à vie dans la mesure où l'on en prend raisonnablement soin. Encore aujourd'hui, ce formidable organe ne reçoit pas toute l'attention auquel il a droit car son rôle est banalisé ou sous-estimé (Witkowski et Parish, 1993).

---

1 *Tegumentum* qui signifie couverture. La peau est aussi appelée tégument.

1.3.1 Généralités

La peau épouse tous les contours du corps. Sur un adulte, elle s'étend sur une superficie de 1.2-2 m^2 selon le nomogramme[2] de Millington et Wilkinson (1983)— cette évaluation ne tient pas compte des détails de faux plis, de plis microscopiques et de la topographie de la peau. La peau constitue 7% de la masse du corps humain (Goldsmith, 1990). Son épaisseur varie principalement selon le site anatomique (Lanir, 1987). Par exemple, à la plante du pied, l'épaisseur est *maximum* (~6.0 mm) tandis qu'à la paupière, elle est *minimum* (~0.2 mm). La peau reçoit le tiers du volume sanguin circulatoire (Wysocki, 1995).

1.3.2 Structure de la peau

La peau humaine se divise en deux couches schématisées à la figure 1.1: l'épiderme et le derme. D'une part, l'épiderme est une couche superficielle mince (60-600 µm) de la peau (Wysocki, 1995). D'autre part, le derme est la couche sous-jacente de l'épiderme et son épaisseur varie beaucoup (0.2-6 mm) (Lanir, 1987). Ces deux couches sont liées par une membrane très mince (~50 nm selon Montagna et Parakkal, 1974) qualifiée de basale (absente à la figure 1.1). La peau est fixée au pannicule adipeux (hypoderme, voir figure 1.1). Ce dernier est composé de lobules graisseux et est situé entre la face profonde du derme et les *fascia* (formation aponévrotique). L'interface assurant le lien dermo-épidermique forme des papilles (très apparentes à la figure 1.1), celle du lien dermo-hypodermique, constituée de crêtes et de creux irréguliers.

L'épiderme est un *épithélium* pavimenteux constitué de différentes couches cellulaires successives à partir de la couche basale (*stratum germinativum*) où s'orchestre la mitose: la couche spineuse (*stratum spinosum*), la couche ganuleuse (*stratum granulosum*) et enfin, la couche cornée (*stratum corneum*). La population cellulaire de l'épiderme est composée à 95% de kératinocytes qui sont des cellules jointives; la sous-population cellulaire est formée de cellules migratoires possédant des formes dentritiques (cellules de Langerhans, cellules de Merkel et mélanocytes). La totalité de l'épiderme se renouvelle à tous les deux mois selon un programme précis de différenciation des kératinocytes— une

---

2 Le nomogramme décrit la surface de la peau en fonction du poids et de la taille d'un individu.

acquisition de différences croissantes des kératinocytes selon la profondeur épidermique. Par exemple, les kératinocytes passent d'une forme cuboïdale (couche basale) à une forme pseudo-ellipsoïdale plate, kératinisée et acellulaire L'épiderme regroupe aussi plusieurs annexes[3] cutanées découlant de la différenciation (tableau 1.1): follicules pilleux, glandes sébacées, glandes sudorales, ongles.

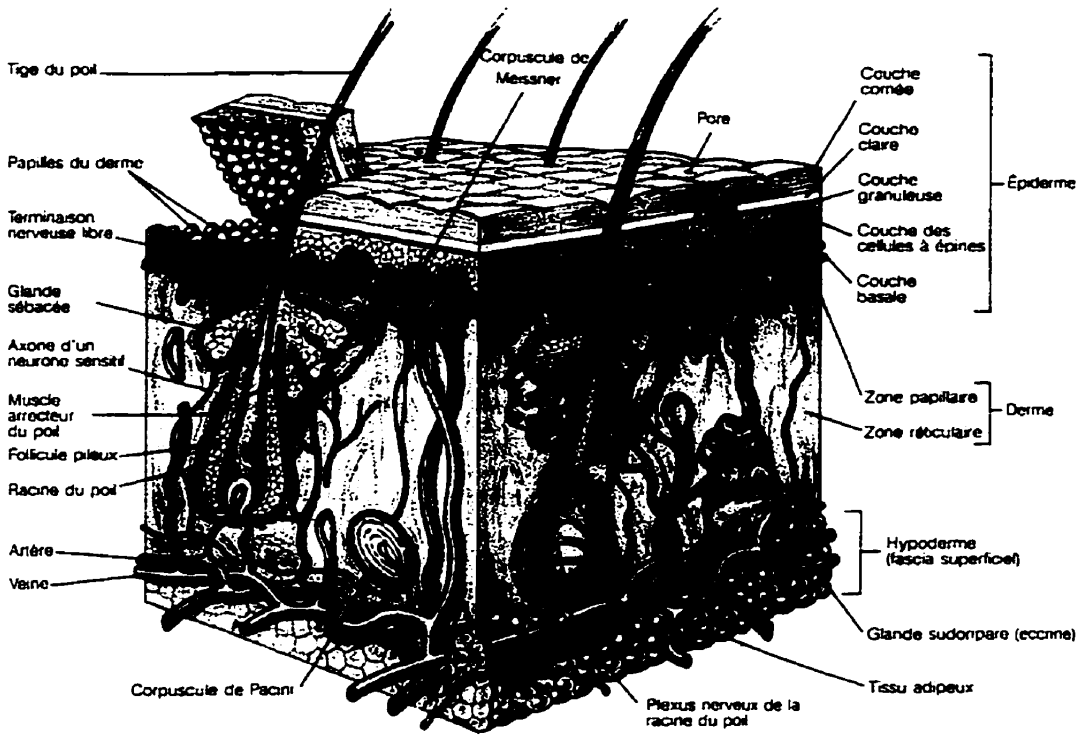


Figure 1.1: Schéma d'une vue tridimensionnelle de l'organe cutané (tiré de Marieb et Laurendeau, 1993). Notes: L'épiderme n'est pas vascularisée et est composée à 95% de kératinocytes (des cellules jointives). Le derme est principalement composée d'eau et de fibres de collagène.

D'autre part, le derme est constitué essentiellement d'eau (incluant les électrolytes et nutriments), de macromolécules formant des structures fibrillaires (collagène) et de cellules (fibroblastes) en beaucoup plus petite densité que dans l'épiderme. Le derme peut

---

3 Les annexes sont des organes temporaires qui dérivent de l'épiderme embryonnaire. Elles jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

se subdiviser en deux zones: le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme papillaire— une faible proportion de l'épaisseur dermique— possède une densité

Tableau 1.1: Estimation produite par Marieb et Laurendeau (1993) de la quantité d'annexes cutanées et de réseaux dermiques inclus dans une biopsie de 1 cm^2 de peau.

Annexes cutanées et/ou réseaux dermiques	Quantités/cm^2 de peau (approximatives)
vaisseaux sanguins	70 cm
neurofibres	55 cm
glandes sudoripares	100 unités
glandes sébacées	15 unités
récepteurs sensoriels	230 unités

Note: Dans cette biopsie, on retrouve approximativement 5×10^5 cellules.

macromoléculaire beaucoup plus faible que la zone réticulaire et compte aussi plusieurs «bouquets capillaires». La particularité du derme réticulaire est sa forte densité en fibres de collagène et élastiques. Dans son ensemble, le derme présente aussi plusieurs récepteurs sensoriels (corpuscules de Meissner et de Pacini) et de surprenants réseaux de neurofibres, vaisseaux sanguins et lymphatiques (voir tableau 1.1).

La structure de la peau varie selon plusieurs facteurs: le site anatomique, l'épaisseur, l'âge, le sexe, le poids, les radiations solaires (UV), la grossesse, la consommation de drogues ou médicaments, les maladies, etc. De plus, la physiologie cutanée est complexe à cause de la diversité des composantes qui s'y trouvent. Il existe plusieurs ouvrages dans la littérature qui traitent en détails de cette complexité: Holbrook (1991); Marieb et Laurendeau (1993); Matlhoko (1994); Millington et Wilkinson (1983); Montagna et Parakkal (1974); Wysocki (1995); Yarkony (1993).

1.3.3 Fonction mécanique de la peau

La peau est un organe aux rôles multiples (Millington et Wilkinson, 1983). De plus, son analyse fonctionnelle est complexe à cause de l'interdépendance entre chacune de ses fonctions. Il existe aussi plusieurs relations homéostatiques entre l'organe cutané et les

autres systèmes de l'organisme (voir diagramme synthétique à la figure 5.11 de Marieb et Laurendeau, 1993). Par exemple, le système osseux procure un support à la peau qui en retour synthétise de la vitamine D nécessaire à l'absorption et au métabolisme normal du calcium.

La peau est une barrière optimale dotée d'une perméabilité sélective (voir revue de Michel, 1995). Cette fonction est certainement la plus indispensable de toutes les fonctions cutanées. Elle prévient l'invasion de microbes, bactéries, parasites ou virus de l'environnement. Parmi d'autres fonction, la peau est aussi un site de réponses immunitaires— «*an immunocompetent organ in itself*», (Allgöwer *et al.*, 1995)— , une réserve d'éléments vitaux (eau, protéines, électrolytes), une interface sensorielle avec l'environnement, un site de thermorégulation et un caractère d'identité (couleur, topographie de l'épiderme) (Millington et Wilkinson, 1983; Montagna et Parakkal, 1974).

Aussi, la peau possède une importante fonction mécanique encore méconnue de plusieurs cliniciens. Cette fonction mécanique, étudiée au cours de cette thèse, revêt un caractère essentiel et affiche une somme surprenante d'informations relatives à la structure cutanée. La peau lie les structures internes et simultanément, permet leur mobilité. En plus, elle alloue des compressions ainsi que de grandes distensions multidirectionnelles de courte et longue durées. Ces distensions sont soit de nature physiologique (hausse de pression intraveineuse et implication mécanique d'autres tissus) ou extrinsèque (voir figure 1.2). Dans les mouvements de tous les jours et particulièrement pendant de vigoureux exercices physiques (activités athlétiques), la peau est soumise à des forces de nature volumique et extrinsèque. Il faut en convenir, la fonction mécanique de la peau est vitale à la transmission d'énergie mécanique dans le corps humain (Kenedi *et al.*, 1975) ou à la dissipation de cette énergie. De plus, la peau (de la couche cornée au tissu profond du derme) sert à protéger les structures vitales sous-jacentes des vicissitudes des *trauma*. Elle contribue également à la fonction de préhension (topographie de l'épiderme).

En conséquence, la fonction mécanique cutanée peut s'expliquer par sa souplesse, son élasticité, sa résistance mécanique et plusieurs autres propriétés biomécaniques. Du point de vue des cliniciens, ces propriétés peuvent apparaître «ésotériques» et peu utiles. Cependant, de plus en plus de méthodologies, décrivant la fonction mécanique cutanée, donnent accès à un *monitoring* des effets des maladies (*e.g.* conditions circulatoires

pathogènes), des produits pharmacologiques et des produits cosmétiques de façon objective (Edwards et Marks, 1995). Depuis peu, l'alternative à ces méthodologies était «l'oeil et le toucher». Dans ces conditions, le diagnostic, le suivi des traitements et l'évaluation de l'efficacité de différents traitements sont très complexes même pour un clinicien très expérimenté.

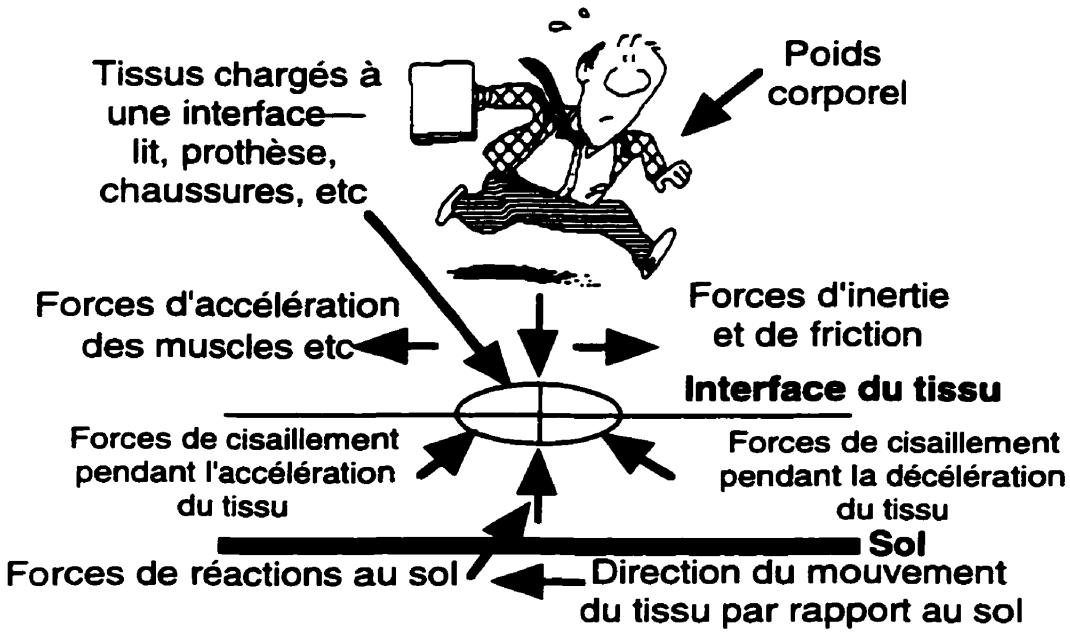


Figure 1.2: Représentation schématique des forces interagissant aux points de contact du corps humain (Matlhoko, 1994). Note : le mouvement du pied par rapport au sol dans l'étude de la marche.

1.4 La reconstruction de la peau: l'essor de l'ingénierie tissulaire

1.4.1 Le problème de l'organe manquant

Personne ne meurt du veillissement de la peau. Cependant, chez les personnes âgées, le vieillissement de la peau a un impact significatif sur les fonctions cutanées et donc, sur leur qualité de vie (Allman, 1989; Phillips, 1994; Yarkony, 1993). Par exemple, la prévalence de plaies de pression— une rupture de la structure anatomique normale et des fonctions de la peau qui résulte de forces externes associées à des proéminences osseuses et qui ne se cicatrise pas de façon ordonnée et opportune[4] (Margolis, 1995)— de cette

[4] Cette définition est consistante avec les définitions de la *Wound healing Society* et du *National Pressure Ulcer Advisory Panel.*

population varie de 2-24% et s'élève jusqu'à 66% dans des cas de fractures fémorales (Ferguson-Pell, 1996). Le problème des plaies est aussi marquant chez les blessés médullaires (Ferguson-Pell, 1996; Phillips, 1994; Yarkony, 1993). Aux États-Unis, on recense chaque année approximativement un million de plaies de pression. Dépendemment de la sévérité de la plaie, les coûts estimés par plaie sont de $2 000-40 000 U.S. (Ferguson-Pell, 1996).

Parmi tous les dommages cutanés et les autres *trauma* de l'organisme, les brûlures constituent sans contredit un des plus grands défis cliniques. Lorsque l'organe cutané est manquant, le grand brûlé doit lutter très rapidement contre la déshydratation et les infections (Yannas, 1995). Différentes techniques permettent de traiter le choc hypovolémique (pertes critiques de liquides) et de protéger le sujet contre les risques d'infection mais plusieurs d'entre-elles s'avèrent des moyens d'intervention temporaires (*e.g.* peau de cadavre, polymères naturels ou synthétiques) (Demling, 1985; Gallico III, 1990; Millington et Wilkinson, 1983; Seah, 1992; Silver et Doillon, 1989). De plus, les coûts associés aux hospitalisations et aux traitements d'un grand brûlé sont impressionnants (jusqu'à $150 000 U.S.) (Rees et Dimick, 1992). À Québec entre 1984 et 1994, le Centre Suprarégional des Grands Brûlés qui offre un support suprarégional pour tout l'Est du Québec, a enregistré 969 admissions pour des brûlures pendant la période 1984-94 (La Presse, 30 avril 94). Aux États-Unis, l'incidence de brûlures dans la population est de 1% par an (Helm, 1992). Le problème atteint des proportions considérables si on considère que sur 2 150 000 brûlés par an, il y aura 150 000 admissions dont 10 000 succomberont (Langer *et al.*, 1993). Par ailleurs, d'autres cas de perte cutanée irréversible découlent de maladies comme le diabète, sur de plus longs termes (Langer et Vacanti, 1993; Phillips, 1994)

Typiquement, les tissus et organes d'humains adultes ne se régénèrent pas, sauf pour de rares exceptions comme l'épiderme. Cela démontre presqu'invariablement que la perte de l'organe cutané est un procédé irréversible. Le tissu cicatriel qui se forme à la suite de la perte tissulaire, manque largement la structure et la fonctionnalité du tissu perdu. L'exemple le plus évident implique la perte de grandes surfaces de peau occasionnée par des brûlures (thermique, chimique ou électrique) de troisième degré où la peau est détruite sur toute son épaisseur.

Aucun des recouvrements cutanés temporaires ne peut substituer l'organe manquant— à la fois sa structure et ses fonctions— à long terme. Les raisons qui en découlent sont diverses. D'une part, les allogreffes provoquent une réaction immunitaire élevée amorçant leur rejet et peuvent aussi être porteuses de *virus* (Gallico III, 1990; Seah, 1992; Yannas, 1996). De plus, la création de banques d'allogreffes (Bondoc *et al.*, 1971) représente un problème étant donné la rareté du tissu et les coûts inhérents à la technique. D'autre part, les polymères naturels ou synthétiques fournissent peu de guérison par intention secondaire (*i.e.* favoriser la formation d'un néotissu sous-jacent) et souffrent dans bien des cas de problèmes de biocompatibilité.

Brièvement, on peut compter trois approches permettant de résoudre à long terme le problème de la perte de l'organe cutané chez les grands brûlés:

I— l'autogreffe,

II— l'organogénèse *in vitro* du tissu cutané à partir de cellules autologues,

III— la régénération *in situ* du tissu cutané à l'aide de matrices polymères.

L'autogreffe est une des premières techniques de remplacement de la peau (vers 1804) et demeure toujours une solution très appréciée démontrant d'excellents résultats (Gallico III, 1990). Face à la rareté de la peau intacte, les cliniciens procèdent à l'expansion de l'autogreffe en la transformant en résille (greffe en filet) (Tanner *et al.*, 1964). L'autogreffe en résille donne cependant de faibles résultats cosmétiques. Cette autogreffe augmente la surface de la peau lésée et, compte tenu de la surface cutanée disponible, cette technique présente rapidement des limites. C'est alors que le véritable problème de l'organe manquant se pose.

Les approches par organogénèse *in vitro* (*II*) et régénération *in situ* (*III*) s'inscrivent dans le cadre d'une nouvelle science très prometteuse visant à résoudre le problème de l'organe manquant: l'ingénierie tissulaire. Selon le *Scientific American*, il s'agit d'une TECHNOLOGIE CLÉ du prochain siècle (Langer et Vacanti, 1995). L'ingénierie tissulaire telle que décrit par le *National Science Foundation* (États-Unis) en 1988 est l'application des principes et méthodes de l'ingénierie et des sciences ayant comme objectifs la compréhension fondamentale des relations entre la structure et la fonction des tissus normaux et pathologiques et le développement de substituts biologiques afin de remplacer, maintenir ou améliorer les fonctions tissulaires (Langer et Vacanti, 1993;

Nerem et Sambanis, 1995; Skalak, 1993). L'ingénierie tissulaire forme un champ de compétences multidisciplinaires où déjà plusieurs chercheurs concentrent leurs intérêts en ce sens, et constitue une option incontournable (Nerem et Sambanis, 1995). Ici au Québec (LRGB/LOEX), cette approche a ouvert des voies tout à fait innovatrices en angiogénèse (L'Heureux *et al.*, soumis) et en orthopédogénèse (Goulet *et al.*, 1997). Aujourd'hui, l'application cutanée est certainement l'une des plus avancées de l'ingénierie tissulaire (Skalak, 1993) et contribue grandement à l'essor de cette nouvelle science et à son succès.

1.4.2 L'équivalent cutané cultivé *in vitro*: une approche par ingénierie tissulaire

C'est depuis 1983 que les cliniciens se sont tournés vers l'approche par organogénèse *in vitro* offrant la possibilité de reconstruire des feuillets d'épiderme à partir d'une petite biopsie de peau. Les débuts de cette approche furent donc très prometteurs lorsque deux enfants brûlés à 90% et 95% ont été sauvés (Gallico III *et al.*, 1984). Au Québec, déjà plus d'une cinquantaine de grands brûlés ont reçu ce traitement. La méthode de culture épidermique (CÉ) développée par Rheinwald et Green (1975), permet de reproduire l'équivalent de dix milles fois la surface prélevée de l'épiderme— avec seulement 1 cm^2 de peau, on peut reproduire la surface corporelle d'un adulte. L'implantation des feuillets est possible après seulement trois semaines suivant la biopsie. Très tôt aprés la formation de la plaie, un tissu cicatriciel sous-jacent aux feuillets d'épiderme. Par contre, la restructuration de ce tissu cicatriciel en tissu ressemblant au derme (néoderme) prend beaucoup de temps. Dans les cas de brûlures profondes, le tissu néodermique sous-jacent aux feuillets d'épiderme apparaît seulement après deux ans (Compton *et al.*, 1989). De plus, ces feuillets ont mené à des résultats cosmétiques insatisfaisants à cause de l'hypertrophie du tissu cicatriciel (Clungstin *et al.*, 1992). Sans le derme, les feuillets épidermiques sont fragiles et moins adhérents. Sans les fibroblastes du derme, le programme d'épidermalisation est altéré (Goulet *et al.*, 1996; Montagna et Parakkal, 1974; Pittelkow *et al.*, 1991). En conséquence, créer un support dermique possédant les mêmes atouts que le derme est une action incontournable pour le succès d'une reconstruction cutanée.

À l'heure actuelle, les recherches poursuivies dans l'approche (*II*) visent maintenant à développer voire optimiser *in vitro* un ÉC combinant une CÉ et un derme équivalent (DÉ) afin d'améliorer l'adhérence de la CÉ, d'assurer la stabilité de la CÉ lors de sa transplantation et dans les premiers jours suivant la greffe et à long terme, d'améliorer la fonctionnalité et le résultat cosmétique de cette nouvelle peau.

Les premiers ÉC comprenant une CÉ cultivés *in vitro* sur un DÉ, ont été développés par Eugène Bell et ses collaborateurs (Bell *et al.*, 1981; Bell *et al.*, 1983). Jusqu'à ce jour, plusieurs supports dermiques découlent du DÉ développé par Bell *et al.* en 1979— un gel de collagène tridimensionnel ensemencé de fibroblastes. Au sein de notre groupe, les recherches en vue de développer un ÉC «idéal» ont donné lieu à plusieurs travaux d'optimisation *in vitro* ou si l'on veut à l'étude de nouveaux modèles d'ÉC (Auger *et al.*, 1995; Bouvard et al., 1992; Germain *et al.*, 1995; López Valle *et al.*, 1992; López Valle *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1997; Rompré *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1996). Ailleurs, plusieurs sociétés, tel que *Organogenesis Inc.* et *Advanced Tissue Science*, possèdent déjà leur propre produit commercial en ce domaine (*e.g. Living Skin Equivalent*™ et *Apligraf* chez *Organogenesis Inc.*). Quoiqu'il y ait encore très peu de résulats cliniques disponibles sur ces ÉC, la qualité mécanique de ÉC demeure un facteur déterminant dans la réussite de cette jeune technique (Dubertret et Coulomb, 1995; Hull *et al.*, 1990).

Si la production d'ÉC peut servir la cause des grands brûlés, elle constitue aussi un grand potentiel pour les recherches de physiologie cutanée (*e.g.* absorption percutanée: Michel *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1997), de toxicologie, de pharmacologie et de cosmétologie. De plus, les problèmes d'éthique des animaux de laboratoire et la rareté de la peau humaine— conservation et coûts élevés— offrent des possibilités encore plus grandes aux ÉC. Toutes ces raisons justifient les travaux d'optimisation et d'analyse fonctionnelle poursuivis sur ces ÉC.

D'autres chercheurs procèdent différemment avec l'inoculation *in vitro* de cellules autologues dans un derme artificiel (Cooper et Hansbrough, 1991; voir Yannas et Burke au § suivant)— les fibroblastes migrent vers cette matrice et synthétisent une nouvelle structure dermique, et subséquemment, les kératinocytes seront à leur tour disposés sur ce *néo*-derme. Selon Hansbrough et Boyce, cette nouvelle peau dévoile une excellente

intégrité structurelle deux à trois semaines suivant la greffe (voir Seah, 1992). Faisant usage du même principe, d'autres laboratoires ont développé des matrices fibrillaires de nylon (*Advanced Tissue Sciences* cité dans Stoppie *et al.*, 1993) et des matrices de polymère biodégradable (*Polyactive*™, van Dorp *et al.*, 1994; *(poly) glycolic acid* ou *polyglactin-910*, Yannas, 1995). Selon Auger *et al.* (1995), il n'existe pas encore de résultats *in vivo* décrivant les effets physiologiques et immunologiques de ces matrices de nature allogénique.

La dernière approche de régénération *in situ* (*III*) développée surtout par Yannas et Burke est un derme artificiel de collagène-glycosaminoglycanne acellulaire favorisant la formation d'un nouveau tissu dermique *in situ* (Ellis et Yannas, 1996; Yannas *et al.*, 1982; Yannas, 1995). Une fois le derme artificiel déposé sur la plaie, les fibroblastes migrent vers cette matrice et synthétisent une nouvelle structure dermique. Subséquemment, la CÉ sera transplantée lors d'une seconde greffe. Des essais cliniques multicentres aux États-Unis ont démontré des résultats satisfaisants en ce qui concerne la «prise» de ce derme artificiel (Heimbach *et al.*, 1988, cités dans Seah, 1992).

Tous les substituts cutanés évoqués par les approches (*I*) et (*II*) comportent leurs avantages et désavantages. Cependant, peu d'entre-eux ont été évalués objectivement au niveau du rôle mécanique qu'ils auront à jouer tôt ou tard sur un patient. Dans cette thèse, cette question de l'évaluation de la qualité mécanique des ÉC est discutée sur la base de plusieurs fonctions mécaniques de la peau normale humaine *in vivo*.

CHAPITRE II
REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La biomécanique cutanée: les composantes et leurs rôles

2.1.1 Le gel dermique

L'organe cutané est un composite complexe de tissus dont les fonctions dépendent d'une part, d'interactions mutuelles entre ses parties constituantes (Marks, 1991) et d'autre part, des autres systèmes de l'organisme (voir diagramme des relations homéostatiques de Marieb et Laurendeau, 1992). La plupart des fonctions biomécaniques de la peau sont supportées par le derme; il existe quelques exceptions où l'épiderme plus épais joue un rôle tout aussi important (*e.g.* les pieds et les mains).

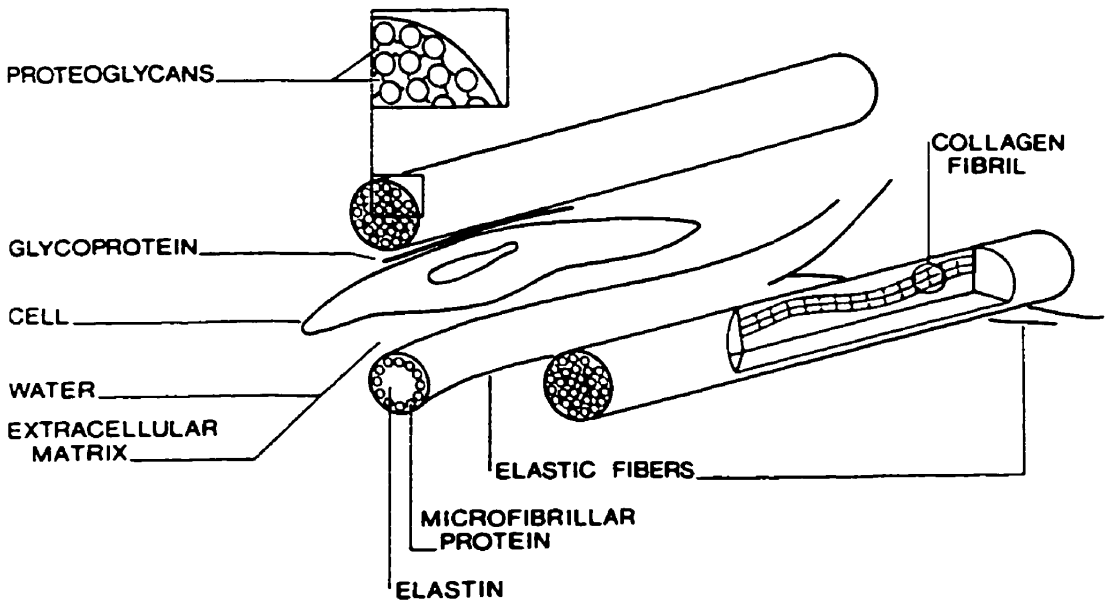


Figure 2.1: Représentation schématique des composantes du derme (Silver, 1987).

Le derme est un gel, une substance naturelle intégrée à plusieurs systèmes biologiques (Fung, 1993; Zweifach, 1970). Le gel dermique renferme principalement de l'eau et d'importantes macromolécules[5] (Lapière *et al.*, 1988; Lodish *et al.*, 1995; Millington et Wilkinson, 1983; Montagna et Parrakal, 1974; Silver, 1987; Uitto et Eisen 1987): le collagène, l'élastine, les glycosaminoglycannes (GAGs) et les protéoglycannes (PGs) (voir figure 2.1 et tableau 2.1). En quantité moindre, on compte les fibroblastes indispensables à l'intégrité du tissu et dont les rôles sont souvent comparés à une «usine» et un «architecte». De la papille dermique à l'hypoderme, les macromolécules sont les mêmes. Dans cette profondeur cutanée, c'est l'organisation structurale ainsi que la densité de ces macromolécules qui caractérisent le derme et par conséquent, qui déterminent les propriétés fonctionnelles dermiques (Lapière *et al.*, 1988; Lanir, 1979a; Lanir, 1979b). Parmi les fonctions du derme, il y a surtout celle de nature mécanique et une autre protectice. Par exemple, une fonction primaire est de supporter des chargements multidirectionnels (une énergie mécanique) et de dissiper l'énergie mécanique.

Tableau 2.1: Proportion des principales macromolécules de différents tissus, en pourcentage de poids de tissu déshydraté (% par PTDH), d'après Grant et Prockop (1972).

Tissu	**Collagène** (% par PTDH)	**Élastine** (% par PTDH)	**GAGs et/ou PGs** (% par PTDH)
Aorte	12.0-24.0	28.0-32.0	5.9
Cartilage	46.1-63.7	—	20.4-37.1
Cornée	68.1	—	4.5
Ligamentum nuchae	17.0	74.8 (78-83)*	—
Os cortical	22.8	—	0.2
Peau	71.9	0.6-2.1	faible
Poumon	10.0	3.0-7.0	—
Tendon d'Achille	86.0	4.4	0.5

* D'après Jenkins et Little (1974).

5 Dans ce contexte, *macromolécule* désigne une longue chaîne de molécules polymères, c'est-à-dire au moins une trentaine de monomères (poids moléculaire variant de 10^4-10^7 da). Ce concept de chaîne moléculaire consistant en des atomes reliés par des liaisons covalentes, est aussi vieux que la chimie moderne et donc, il date des origines de la formulation graphique des composés introduite par Couper en 1858 (Flory, 1976).

Selon Hsu (1992), un gel est plus difficile à reconnaître qu'à définir. Relativement à la description de Flory[6] (voir Hsu, 1992), il existe quatre types de gels classifiés selon la structure de leur organisation:

i— Les structures lamellaires ordonnées (*e.g.* les gels savonneux, les phospholipides, la terre glaise). L'organisation de ces gels est très ordonnée puisqu'elle est générée par des forces électrostatiques, de van der Walls ou des interactions dipolaires.

ii— Les réseaux covalents polymères complètement désordonnés (*e.g.* les élastomères). Leur continuité est assurée par une structure tridimensionnelle possédant des liaisons chimiques covalentes.

iii— Les réseaux polymères formés à partir d'agrégations physiques (*e.g.* la gélatine). Ce type de gel est en grande partie désordonné quoiqu'il possède des régions ordonnées localisées. Les macromolécules sont désordonnées comme le type décrit en *ii*, mais la nature physique de leurs attachements intermoléculaires est différente. De plus, ce type possède une structure sol-gel (voir figure 2.2) réversible en variant la température ou suivant une dilution.

iv— Les structures désordonnées particulières (*e.g.* les agrégations fibrillaires ou globulaires comme la coagulation du sang et les blancs d'oeuf). La formation de ce gel est probablement non-spécifique quoique dans certains cas, des interactions spécifiques causant la formation du gel émanent de mécanismes biologiques contrôlés.

Malgré les différences entre ces types de gel, ceux-ci possèdent une propriété commune: chacun constitue un réseau continu (voir figure 2.2c). Parmi les types de gel énumérés précédemment, les types décrits en *iii* et *iv* (voir § précédent) sont les structures qui forment la plupart des gels biologiques.

L'importance des substances macromoléculaires ou polymères comme les gels est comparable à leur ubiquité. Les exemples autour de nous sont nombreux et abondent dans les systèmes biologiques; ils comprennent les matériaux structurels des végétaux et des animaux. Outre la fonction mécanique, les macromolécules élaborées pendant le

---

6 Le 11 décembre 1974, Paul J. Flory a reçu le prix Nobel de chimie pour sa très grande contribution aux théories des substances macromoléculaires.

processus de l'évolution, reproduisent des fonctions complexes de régulation et de reproduction des cellules (*e.g.* l'ADN).

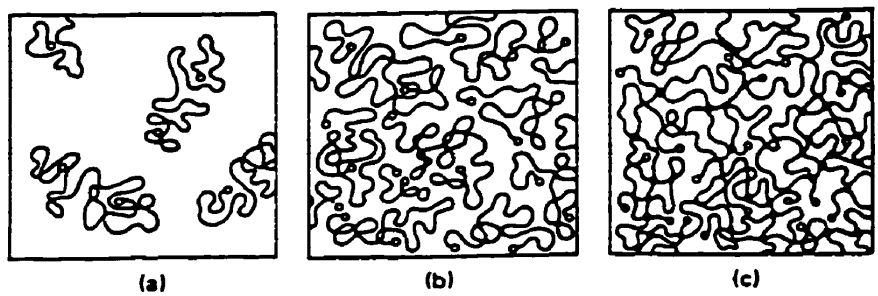


Figure 2.2: Représentation schématique de la transition sol-gel d'aprés Vollmert (1973). (a) Solution colloïdale diluée; (b) Solution colloïdale concentrée; (c) Gel ou réseau continu. Réticulation entre les macromolécules (*«cross-linking»*) (●); Bouts des macromolécules (○).

La caractéristique essentielle d'un gel est son comportement qui rappelle celui d'un solide. Cependant, les atomes d'un solide subissent de petites vibrations alors que dans un gel, les macromolécules bougent relativement librement dans un solvant.

De quelle façon détermine-t-on la liberté de mouvement des macromolécules qui caractérise le gel? La réponse vient en grande partie de la conformation de la macromoléclule elle-même (Vollmert, 1973). Toutefois, le nombre et la variété des conformations moléculaires typiques sont prodigieux. Lorsqu'une macromolécule est soustraite aux contraintes comme dans un parfait solvant, une infinité de conformations sont alors possibles. Les analyses qui traitent de la manière dont une macromolécule peut se disposer dans l'espace, s'apparentent à des principes analogues à d'autres sciences (*e.g.* le principe de marche désordonnée (*«random walk»* ou *«drunkard's walk»*), la diffusion ou le comportement des gaz) (Flory, 1976; McCrum *et al.*, 1990).

La recherche traitant de la conformation des macromolécules provient indubitablement de la nécessité de comprendre les propriétés physiques des matériaux formés de ces macromolécules (Flory, 1976). La thermodynamique, l'hydrodynamique ainsi qu'une variété de propriétés optiques parmi plusieurs autres propriétés, sont des propriétés qui

mettent en évidence l'arrangement moléculaire des gels (Chien et Chang, 1973; Hsu, 1994 et 1992; Martin, 1989; Nguyen *et al.*, 1974; Silver, 1987). La clé est la compréhension de la relation entre la composition chimique et les propriétés biophysiques de ces gels.

2.1.2 Le collagène

Le collagène est une macromolécule abondante chez les mammifères. Selon White *et al.* (1964: cités dans Butler *et al.*, 1978), le collagène constitue environ un tiers de toutes les protéines du corps et représente 6% de la masse corporelle. Cette protéine a joué un rôle critique pendant l'évolution d'organismes complexes où celle-ci leur procure une matrice essentielle à la préservation de leur forme, à l'agrégation de macromolécules, de glycoprotéines, de polymères hydratés et d'ions inorganiques, et à l'adhésion cellulaire (Kadler, 1994). Cette protéine préserve l'intégrité de plusieurs tissus dont certains sont rigides comme les tendons, les ligaments, le cartilage et les os, et dont d'autres sont plus mous comme la peau et les vaisseaux sanguins (voir tableau 2.1).

Tableau 2.2: Les types de collagène de la peau (Burgeson, 1982; Millington et Wilkinson, 1983; Uitto et Eisen, 1987; Wenstrup *et al.*, 1991; Berthod *et al.*, 1997).

Type	Pourcentage du collagène cutané	Arrangement structural	Site cutané
I	85-90	fibres, fibrilles	derme
III	8-11*	fibrilles	papille dermique
IV	faible	réseau lâche (non-fibrillaire)	membrane basale (couche dense)
V	2-4	microfibrilles	interstices interfibrillaires
VI	faible	microfibrilles	péri-cellulaire
VII	faible	microfibrilles d'ancrage	membrane basale
XII	faible	microfibrilles, fibrilles	surface des fibrilles, follicule pilleux
XIV	faible	microfibrilles	surface des fibrilles

Dans la peau, on retrouve cette molécule surtout sous forme cylindrique («*rod-like*») intégrée à une structure fibrillaire et elle correspond généralement au type I du collagène (voir tableau 2.2). Le collagène de type I accomplit un rôle mécanique majeur pour un grand nombre de structures biologiques. Les fibrilles de collagène apparaissent chez les tissus où la résistance mécanique est nécessitée (e.g. la peau, les ligaments, les tendons). Selon Lodish *et al.* (1995), si on compare gramme pour gramme le collagène à l'acier, il est étonnamment plus résistant que l'acier. En contrepartie, la façon dont le collagène contribue aux propriétés mécaniques chez ces tissus, est toujours partiellement incomprise.

2.1.2.1 Structure de la molécule de collagène de type I

La molécule de collagène de type I possède un poids moléculaire[7] approximatif de 290 000 da (Uitto et Eisen, 1987) et possède un diamètre approximatif de 1.4-1.5 nm (Kadler, 1994). La molécule de collagène est construite à partir de trois chaînes polypeptidiques (ou chaînes α) dont deux sont identiques (Lodish *et al.*, 1995; Uitto et Eisen, 1987; Wenstrup *et al.*, 1991). Ces chaînes sont enroulées sur elles-mêmes pour former une structure triple-hélice ou structure en toron .

Chacune de ces chaînes α possède approximativement 10^3 acides aminés constitués par une répétition du triplet [-X-Y-Gly-] où Gly est la glycine, et X et Y sont les positions d'acides aminés différents de Gly. Plus spécifiquement, les chaînes α contiennent en proportion quasi-identique (20-22%) de la proline (seulement en X) et de la 4-hydroxyproline (seulement en Y). La Gly représente le tiers des 10^3 acides aminés (voir tableau 23.2 de Uitto et Eisen, 1987). La stabilité moléculaire du collagène est essentiellement associée aux liens hydrogènes supportant ces trois chaînes α: un lien pour trois acides aminés (Traub et Piez, 1971 cités dans Wenstrup *et al.*, 1991). Par exemple, suivant une réduction de la proportion de 4-hydroxyproline, il est admis que le collagène est instable (*i.e.* perte de liens d'hydrogènes) et se dénature à des températures au-dessus de 20°C (voir figure 24.11 de Lodish *et al.*, 1995; Uitto et Eisen, 1987; Wenstrup *et al.*, 1991).

---

7 L'unité du poids moléculaire est le dalton (da) qui équivaut à $1.66056 \cdot 10^{-27}$ kg.

2.1.2.2 Assemblage du collagène de type I

Le collagène de type I est synthétisé et sécrété dans l'espace extracellulaire par les fibroblastes sous une forme macromoléculaire dénommée «procollagène». En plus des trois chaînes α, cette forme présente deux peptides situés à ses extrémités, soit N- et C-propeptides (voir figure 2.3). Pour que l'assemblage du collagène de type I débute, les molécules de procollagène doivent être converties en des molécules plus matures: *i.e.* lorsque des enzymes spécifiques (e.g. métallo-protéinases) séparent N- et C-propeptides des trois chaînes α. Cette nouvelle macromolécule plus mature est appelée «tropocollagène» (Lapière *et al.*, 1988; Kadler, 1994; Uitto et Eisen, 1987). Une atteinte de *dermatosparaxis* est caractérisée par une extrême fragilité de la peau causée justement par un manque de N-peptidase (Kadler, 1994, Lapière *et al.*, 1988).

L'assemblage du collagène se produit suivant deux types de croissance, soit celle «linéaire» (accolement bout-à-bout des molécules) et celle «latérale» (production de «*cross-links*»), produisant des liens intermoléculaires covalents (Kadler, 1994). D'une part, la croissance linéaire est réalisée grâce aux reconnaissances spécifiques entre les molécules de collagène. Ces reconnaissances spécifiques se produisent par l'intermédiaire de structures spécialisées résultant de la séparation des N- et C-propeptides et situées aux extrémités des molécules: respectivement, les N- et C-télopeptides. D'autre part, la forme la plus commune de croissance latérale est produite *via* les acides aminés lysine et hydroxylysine des chaînes α (Uitto et Lichtenstein, 1976).

Pendant l'assemblage, les molécules de tropocollagène sont alors alignées et décalées approximativement du quart de leur longueur (voir le modèle unidimensionnel de l'assemblage collagénique de Hodge-Petruska dans Sasaki et Odajima 1996b; Kadler, 1994) pour constituer un premier niveau de structure, soit une microfibrille (figure 2.3). Observé à la microscopie électronique, cet assemblage forme des structures convolutées ou ondulées, et striées (Comninou et Yannas, 1976; Finlay, 1969; Hunter et Finlay, 1973; Kenedi *et al.*, 1975; Millington et Wilkinson, 1983; Silver, 1987; Viidik, 1973, Yahia, 1984). L'angle d'ondulation des structures collagéniques de type I peut atteindre une amplitude *maximum* de 40° (Hunter et Finlay, 1973: cités dans Comninou et Yannas, 1976) et varie de 20° à 12° dès l'enfance à l'âge adulte (Millington et Wilkinson, 1983).

Historiquement, les fibrilles de collagène ont été identifiées par leur caractéristique striée («*D-periodicity*») attribuable à une discontinuité périodique spécifique des molécules. La valeur précise de cette caractéristique striée est dépendante de la source du collagène, de l'humidité et des traitements chimiques utilisés. Dans le cas de la peau en état hydratée, cette valeur est équivalente à 64 nm (Kalder, 1994). Ainsi, la déshydratation du tissu aura tendance à faire chuter cette discontinuité: *e.g.* pour le tendon de 67 à 64 nm. Selon Hodge et Petruska, la longueur de la molécule de collagène est équivalente à 4.4 fois cette caractéristique striée et donc, équivalente approximativement à 282 nm.

Tableau 2.3: Diamètre des fibrilles de collagène de type I *in vivo*.

Source	**Diamètres des** fibrilles [fibres] **(nm)**	**Références**
Embryon de poulet	20-100	Fleischmajer *et al.* (1983)
Espèces & sites confondus	20-40 [200-1 200]	Fung (1993)
Peau humaine	[10 000-50 000]	Hunter et Finlay (1973)
Peau humaine	50-100	Kadler (1994)
Tendon de poussin	50	Parry (1988)
Papille dermique Derme réticulé	7-120 [300-3000] [10 000-40 000]	Silver (1987)
Espèces & sites confondus	20-60	Viidik (1973)*
Peau humaine	30-60 [10 000-15 000]	Wijn (1980)

* Selon Viidik (1973), plusieurs auteurs utilisent «microfibrilles» lorsque le diamètre varie entre 20 et 100 nm, et «fibrilles», entre 200-500 nm.

Note: De récentes données ont démontrées que les plus grosses fibrilles de collagène de type I du ligament, du tendon, de l'os et de la peau, sont en fait des fibrilles hybrides de type I, III et V (Kadler, 1994).

À l'intérieur du derme, on retrouve plusieurs niveaux de structures collagéniques qui résultent de l'agrégation de microfibrilles ou de fibrilles (voir figure 2.3). D'une part, le diamètre et la longueur des unités collagéniques de la peau sont variables et difficiles à quantifier puisque celles-ci se retrouvent enchevêtrées à l'intérieur de réseaux souvent très denses (voir tableau 2.3). D'autre part, l'orientation des unités collagéniques (types I et

III) s'établit suivant un plan parallèle à la surface de la peau (Finlay, 1969; Hunter et Finlay, 1973) et la distribution angulaire est généralement définie par l'orientation des tensions maintenues *in vivo* (Dupuytren, 1834; Langer, 1978).

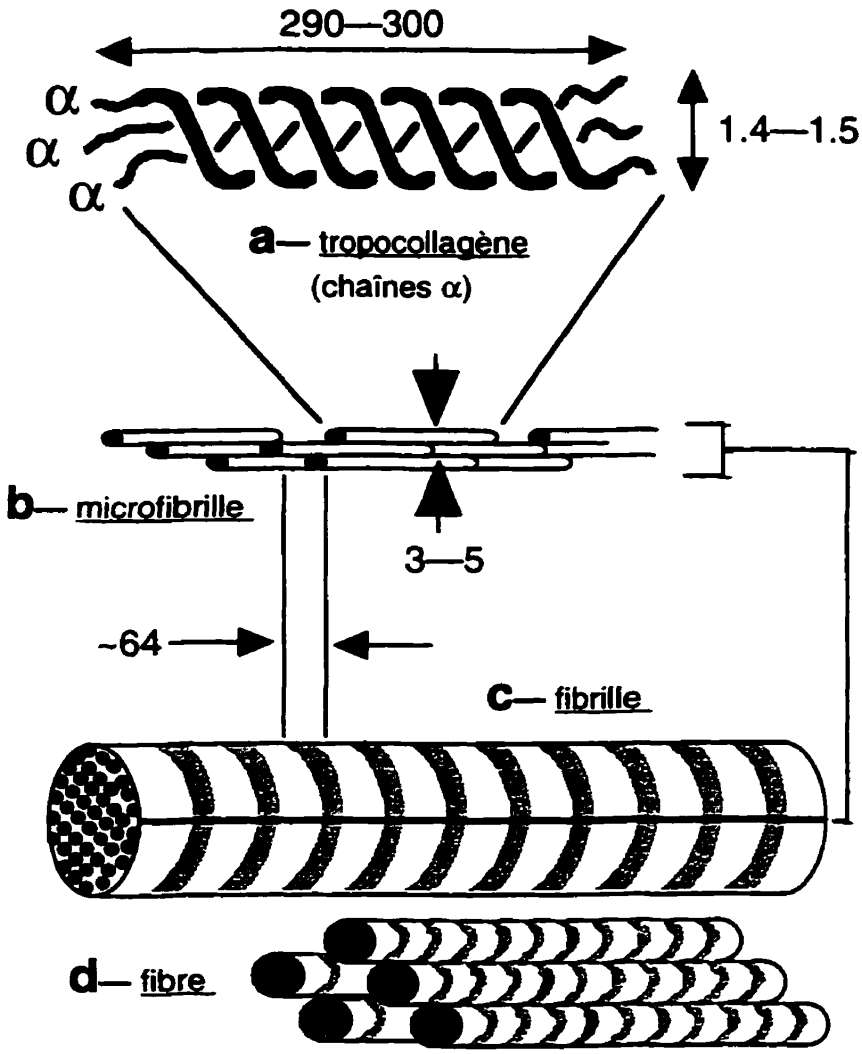


Figure 2.3: Représentation schématique de l'assemblage du collagène type I d'après Kadler (1994), Montagna et Parakkal (1974), Uitto et Eisen (1987). (a) Molécule de tropocollagène composée de chaînes α; (b) Microfibrille; (c) Fibrille; (d) Fibre. Toutes les dimensions sont en nanomètre.

2.1.2.3 Fibrillogénèse *in vitro* du collagène de type I

Les plus anciennes expériences *in vitro* sur le collagène, soit son extraction d'une structure tendineuse, remontent au début du siécle (Ehrmann et Gey, 1956). Par contre, c'est seulement dans les années 1950 que l'idée de comprendre la fibrillogenèse *in vivo* à partir d'expériences *in vitro* a véritablement pris son envol (Wood et Keech, 1960). La croissance des fibrilles de collagène des tissus de culture a surtout été étudiée au moyen de techniques de microscopie électronique.

In vitro, le tropocollagène s'assemble spontanément (c'est l'«auto-assemblage») pour former des fibrilles selon un procédé identifié comme étant la *fibrillogénèse* (Prockop *et al.*, 1979). La longueur et le diamètre des fibrilles de collagène varient beaucoup selon les conditions de croissance. Quoique plusieurs études aient portées sur la fibrillogénèse du collagène et les mécanismes physiques et/ou biologiques la contrôlant (voir revue de Kadler, 1994), celle-ci demeure une grande question. Est-ce que la morphologie (diamètre et longueur) des fibrilles de collagène de même que leur disposition spatiale émergent d'un simple procédé physique? Selon Kadler *et al.* (1987), ce procédé est purement thermodynamique: *i.e.* les interactions hydrophobes entre les molécules de collagènes mènent spontanément à la minimisation de la surface exposée à l'eau et causent la formation de microfibrilles.

Jusqu'à maintenant, les procédés rapportés sont hypothétiques quoique certaines expériences menées *in vitro* représentent un potentiel fort valable. Par exemple, les N- C-protéinase modifiant le procollagène influencent le diamètre des fibrilles. Le calibre des fibrilles est plus petit lorsque l'on polymérise un collagène qui possède toujours à son bout un N-propeptide comparativement au tropocollagène libéré de ses N- C-propeptides (Lapière et Nusgens, 1974). Si l'extrémité C-propeptide est retirée de la molécule de collagène avant N-propeptide, le calibre des fibres est plus fin et à l'inverse, le calibre sera plus gros (Miyahara *et al.*, 1984). De plus, d'autres facteurs influencent la fibrillogénèse *in vitro* du collagène: la concentration des macromolécules, l'environnement ionique et la présence d'autres macromolécules (d'autres types de collagène, GAGs, etc.) (Kadler, 1994; Silver, 1987; Trelstad *et al.*, 1974, Wood et Keech, 1960). Le collagène de type III est aussi un puissant inhibiteur d'interaction interfibrillaire du collagène de type I (Notbohm *et al.*, 1993). Plus grande sera la proportion du collagène de type III (*i.e.*

jusqu'à 30%, tel que convenu pour le derme), plus petit sera le calibre des fibrilles (Lapière *et al.*, 1977). Ce procédé est aussi particulièrement observé dans le tendon (peu de collagène de type III) où le calibre des fibrilles est gros tandis que dans les vaisseaux sanguins (réseau de collagènes de types I et III), le calibre des fibrilles est plutôt fin.

A priori, il est très difficile de prédire la longueur et le diamètre des fibrilles résultants de la fibrillogenèse. Toutefois, il existe deux hypothèses concernant la croissance latérale des fibrilles (Silver et Miller, 1994). La première hypothèse veut que les fibrilles soient un assemblage de plus petites structures compressées, les microfibrilles. Une microfibrille est un groupe pentamère de molécules arrangés en toron (Trus et Piez, 1980). La seconde hypothèse veut que l'arrangement moléculaire des fibrilles soit crystalline et qu'il n'y ait pas de structure microfibrillaire (Hulmes et Miller, 1979). Dans les deux cas, les «unités collagéniques» issues de la croissance latérale— un groupe pentamère de molécules— possèdent une section quasi-hexagonale dont l'axe le plus grand atteint environ 4 nm. D'après Piez (1982), c'est l'énergie de crystallisation interne et le contenu en eau des microfibrilles qui forceraient le passage du groupe pentamère d'une section à géométrie pentagonale à quasi-hexagonale.

Tableau 2.4: Diamètre des fibrilles de collagène de type I reconstituées *in vitro* à 37°C.

Source	Diamètres des fibrilles (nm)	Références
Tendon de rongeur	90-400	Allen *et al.* (1984)
Peau de rats *Witstar*	50-200	Danielsen (1981)
Peau bovine fœtale	70-140‡	Kadler (1994)
Tous espèces et sites confondus	jusqu'à 500	Parry et Craig* (1984: cités dans Parkinson *et al.*, 1995)
Peau bovine	20-120 (moyenne de 50)	Wood et Cheek (1960)

‡ Fibrilles reconstituées à 34°C.
* Selon Parry et Craig, les fibrilles sont généralement de longueur supérieure à plusieurs dizaines de µm et contiennent entre 10^4-10^6 molécules de tropocollagène.

À une autre échelle, les examens à la microscopie électronique montrent que l'assemblage de microfibrilles conduit à des fibrilles de collagène de calibre très variable (tableau 2.4). Les fibrilles reconstruites à 37°C sont très similaires au niveau des diamètres, de la rondeur et de la flexibilité apparente, aux fibrilles de collagène *in vivo* (Kadler *et al.*, 1990). Plus récemment, des modèles de diffusion («*diffusion limited aggregation*») (Parkinson *et al.*, 1995) et de percolation (Hsu, 1992) ont été appliqués afin de simuler la croissance des fibrilles de collagène mais la validation de ceux-ci leur procure un champ d'application plutôt réduit.

Par ailleurs, d'autres études concernant les fibrilles de collagène assemblées *in vitro* ont porté sur leur distribution spatiale à l'intérieur de gels. La distribution spatiale des fibrilles est fondamentale puisque les fibroblastes se réorientent et migrent selon la direction principale des fibrilles de collagène (pour courte revue: Guido et Tranquillo, 1993; Dickinson *et al.*, 1994). Selon Lapière *et al.* (1988), la polymérisation d'une solution de collagène survient suite à une élévation de la température à 37°C, que la solution soit préalablement agitée ou non. Cette polymérisation du collagène mène à une distribution randomisée de fibrilles sans faisceau et moins dense que la structure collagènique du derme normal humain. Dans ce gel de collagène, les fines fibrilles de collagène sont très enchevêtrées formant ainsi des noeuds (Allen *et al.*, 1984) (voir figure 2.4).

Peut-on guider la distribution des fibrilles lors de la polymérisation d'un gel de collagène? Pendant la polymérisation, l'introduction d'un mouvement uni-directionnel à la solution collagénique conduit à une orientation parallèle au mouvement des fibrilles (voir micrographies à contraste de phase dans Lapière *et al.*, 1988). Par ailleurs, d'autres méthodes telles que l'écoulement, l'étirement, la convection ordonnée (gradient de concentration de collagène ou gradient de température) et de faibles courants électriques, ont été développées afin de provoquer une orientation des fibrilles. Toutefois, il s'avère que les distributions résultantes de certaines de ces méthodes laissent des doutes sur leur efficacité et leur applicabilité à des gels tridimensionnels utilisés en ingénierie tissulaire (Guido et Tranquillo, 1993). Selon Guido et Tranquillo (1993), contrairement aux autres méthodes, l'application d'un champ magnétique fort pendant la polymérisation favorise l'orientation des fibrilles de collagène dans un gel tridimensionnel et constituerait une

méthode plus simple, systématique et reproductible (*e.g.* l'équivalent-*média* de Tranquillo *et al.*, 1996).

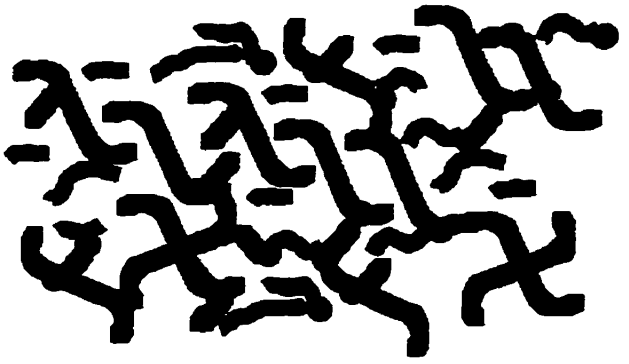


Figure 2.4: Représentation schématique d'une distribution randomisée de fibrilles de collagène à l'intérieur de gels produits *in vitro*, d'après les observations de Allen *et al.* (1984) et Lapière *et al.* (1988). Réticulation entre les fibrilles («*cross-linking*») (●).

2.1.2.4 Interactions fibroblastes-fibrilles de collagène de type I

Il existe un *consensus* sur le fait que le phénotype de plusieurs types cellulaires est typiquement plus près de celui *in vivo* lorsque les cellules sont ensemencés dans un gel de collagène tridimensionnel plutôt que sur des surfaces bidimensionnelles (Allen, 1984; Bell *et al.*, 1979; Bell *et al.*, 1981; Dunn *et al.*, 1991; Ehrmann et Gey, 1956; Germain et Auger, 1995; Germain *et al.*, 1994; López Valle *et al.*, 1992; Ratner, 1993; Reid *et al.*, 1990). Dans ces gels, les fibroblastes s'attachent et s'étendent sur des fibrilles de collagène les entourant, et ceux-ci adoptent une morphologie allongée et bipolaire (Elsdale et Bard, 1972; Tomasek *et al.*, 1982). L'interaction mécanique de cellules, dotées de motilité comme les fibroblastes, avec les fibrilles de collagène dans l'espace péri-cellulaire est fondamentale dans la compréhension du comportement cellulaire des tissus mous et des équivalents tissulaires (*e.g.* les réseaux de fibrilles de collagène très fortement enchevêtrés et ensemencés de cellules) et de plusieurs problèmes biomédicaux et aux applications d'ingénierie tissulaire. Plusieurs exemples témoignent de ce fait: la morphogenèse (Stopak et Harris, 1982), la contraction induite dans un tissu cicatricel (Germain *et al.*, 1994; Grinnell, 1994), la régénération de tissus (Madri et Pratt, 1986) et

les tissus bio-artificiels (Auger *et al.*, 1995; Ellis et Yannas, 1996; Huang *et al.*, 1993; L'Heureux *et al.*, 1993; L'Heureux *et al.*, soumis; Yannas *et al.*, 1982).

Aprés avoir étudié plusieurs types cellulaire, Harris *et al.* (1981) ont déterminé l'effet de la traction cellulaire appliquée sur des matrices de collagène reprécipitées. Paradoxalement, la traction cellulaire est plus faible chez les cellules les plus mobiles (e.g. les leucocytes). Puisque les fibroblastes génèrent des forces qui excèdent celles nécessaires à leur locomotion et distordent largement les gels de collagène, Harris *et al.* (1981) ont proposé que le réarrangement morphogénésiaque des matrices extracellulaires est la principale fonction des tractions fibroblastiques.

Les tractions cellulaires des fibroblastes réorganisent les fibrilles de collagène et par conséquent, elles contractent le gel de collagène indépendamment de la forme, membranaire ou sphérique (Bell *et al.*, 1979; Guidry et Grinnell, 1985; López Valle *et al.*, 1992; Rompré *et al.*, 1990; Barocas et Tranquillo *et al.*, 1997). Dans le cas de géométries membranaires comme pour le derme, il est possible de contrôler cette contraction puisque celle-ci est dépendante du nombre de cellules, du type et de la concentration en collagène, de la concentration du sérum de culture et de facteurs extracellulaires (*e.g. TGF-β*, *PDGF*, *FGF*, *colcemid* et autres *integrins* et interférons qui interagissent avec le cytosquelette) (Bell *et al.*, 1979; Dans et Isseroff, Delvoye *et al.*, 1991; 1994; Grinnell, 1994; Guidry et Grinnell, 1985; Rompré *et al.*, 1990; Tomasek et Akiyama, 1992), mais indépendante de la synthèse et de la dégradation du collagène (Guidry et Grinnell, 1985). Cependant, le contrôle de la contraction des gels «flottants»— puisqu'ils baignent dans un milieu de culture (*e.g.* le derme équivalent)— pose un sérieux problème d'*optima* et peut conduire à des désordres structurels limitant grandement son application clinique où de grandes surfaces sont nécessitées.

Afin de contrer ce problème de contraction, une instabilité mécanique— plutôt que celles chimiques antérieurement utilisées— a été ajoutée au gel de collagène ensemencé de fibroblastes: *i.e.* l'utilisation d'ancrage (Bell *et al.*, 1979; Harris *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1993; López Valle *et al.*, 1992; Rompré *et al.*, 1990). Avec l'ancrage, le gel subit une contraction selon son épaisseur qui conduit selon la géométrie des gels, à des résultats différents. Dans le cas de géométries membranaires non-axisymétriques, la contraction cause une distribution hétérogène des unités collagéniques menant à des ouvertures

localisées ou ruptures (Stopak et Harris, 1982). Dans le cas d'une géométrie membranaire axisymétrique, la contraction crée un compactage relativement uniforme des fibrilles et sans défaut de pli (López Valle *et al.*, 1992). Dans le modèle dermique proposé par López Valle *et al.* (1992), les distributions des fibrilles de collagène et des fibroblastes du gel qui ressemblent à un derme normal, suivent une orientation dans un plan parallèle à la surface du tissu.

Jusqu'ici, deux études ont été menées afin de quantifier la traction cellulaire induite à l'intérieur des gels de collagène de géométrie membranaire. D'une part, pour des gels possédant une concentration initiale de 10^6 fibroblastes•ml^{-1}, Delvoye *et al.* (1991) ont enregistré, suivant une durée de douze heures, des tractions uniaxiales équivalentes à 9.81-981 dynes. Dans l'expérience de Delvoye *et al.*, (1991), les gels ont subi une contraction latérale et aucune dimension de la section droite sur laquelle s'applique ces tractions, n'a été rapportée. D'autre part, Kolodney et Wysolmerski (1992) ont rapporté pour des gels à une concentration initiale de 0.8×10^6 fibroblastes•ml^{-1}, suivant une durée de vingt-quatre heures, une traction uniaxiale équivalente à 4.5×10^4·dynes•cm^{-2}. Par ailleurs, Barocas et Tranquillo (1995) ont estimé, selon l'application de leur théorie (voir § suivants) sur des microsphères collagéniques et suivant une durée de dix heures, des tractions cellulaires apparement similaires à celles de Kolodney et Wysolmerski (1992).

Par ailleurs, Moon et Tranquillo (1993) ont démontré quantitativement que les fibroblastes exercent leurs tractions sur le réseau de fibrilles dans la direction où ces mêmes cellules ont été préalablement orientées. Ceux-ci ont produit cette démonstration au moyen d'essais de tractions cellulaires produites à l'intérieur d'une microsphère collagénique («*fibroblast-populated microsphere traction assay*»). De plus, il a été démontré que l'utilisation d'une sphère présente des avantages d'alléger la description mathématique, de constituer une isotropie de l'orientation des fibrilles et de mimiser les gradients de diffusion des nutriments et métabolites.

Les mécanismes clés des interactions fibroblastes-fibrilles de collagène peuvent donc être décrit de cette manière:

A — le guidage des fibroblastes au moyen d'un réseau de fibrilles de collagène

B — le remodelage dynamique du réseau collagénique au moyen de tractions cellulaires.

Barocas et Tranquillo (1994; 1995; 1997) ont développé une théorie mathématique générale qui tient compte de ces mécanismes et qui prédit qualitativement avec succès la distribution des fibrilles de collagène résultant du compactage hétérogène produit par ces tractions cellulaires. Cette théorie consiste en un système d'équations intégro-différentielles partielles (*i.e.* (1) une équation de conservation des cellules, (2) une équation de conservation de la masse de la matrice extracellulaire, et (3) une équation d'équilibre des forces des interactions cellules-matrice extracellulaire) définissant la concentration cellulaire, les fractions volumiques, les vitesses du réseau collagénique et de la solution interstitielle, et l'orientation des cellules et des fibrilles de collagène. Conformément à cette théorie, Barocas et Tranquillo (1994; 1995) ont démontré par une application à un essai de tractions cellulaires produites à l'intérieur d'une microsphère collagénique, que tous les paramètres qui se corrèlent avec l'adhésion cellulaire, à l'exception des tractions et migrations cellulaires, sont dépendants du temps.

Quoiqu'il existe des théories décrivant la dynamique des mécanismes *A* et *B* (voir § ci-haut) à l'intérieur des gels de collagène, il n'en demeure pas moins que cette dynamique est complexe surtout s'il s'agit de l'appliquer aux équivalents cutanés où les instabilités chimiques abondent (Goulet *et al.*, 1996; Pittlekow *et al.*, 1991), et où les kératinocytes peuvent générer des tractions additionnelles sur ces gels (Rompré *et al.*, 1990).

2.1.2.5 Propriétés mécaniques des molécules de collagène de type I

Chez les tissus collagéniques, il est important de comprendre la contribution de chaque niveau hiérarchique de la structure (de la molécule au tissu) aux propriétés mécaniques du tissu. La plupart des études microstructurales du comportement mécanique de cette protéine sont des tests de traction uniaxiale de la molécule et de la fibre de collagène (Kwan et Woo, 1989; Lanir, 1988; Sasaki et Odajima, 1996a; Sasaki et Odajima, 1996b). Étant donné la complexité de ces tests, les longues fibres de collagène des tendons ont été

plus fréquemment étudiées (Lanir, 1988; Sasaki et Odajima, 1996a; Sasaki et Odajima, 1996b).

Ainsi, ce sont des expériences sur les tendons qui ont le plus servi à décrire l'élasticité et la viscoélasticité de la protéine de collagène de type I. D'une part, il a été établi que la force *versus* l'allongement soumis à la molécule de collagène, peuvent être normalisés (voir §2.3.1) et interpolés par une relation d'élasticité linéaire («Hookéenne») que l'on associe au module normalisé d'Young (Sasaki et Odajima, 1996a). Le tableau 2.5 affiche une synthèse du résultat de différentes études portant sur le module d'élasticité de la protéine. La variabilité des modules est attribuée essentiellement à la source et au type d'instrumentation utilisé pour les mesures. D'autre part, selon Sasaki et Odajima (1996a), la viscoélasticité de la molécule serait associée au réseau de liens d'hydrogènes intramoléculaires. Selon Suzuki *et al.* (1980), certains de ces liens hydrogènes seraient reliés par des molécules d'eau et dans un état d'hydratation complète, les molécules d'eau liantes seraient fréquemment interchangées avec d'autres molécules d'eau. Ces échanges signifient une rupture et une reconstruction de liens et, correspondent à une dissipation d'énergie telle que vue chez les matériaux viscoélastiques.

Tableau 2.5: Mesures du taux d'élasticité normalisé de la molécule de collagène de type I.

Références	Collagène-type I: source	Module d'élastictié (GPa)	Mesures: instrumentation
Chien et Chang (73)	Peau bovine*	$5 \cdot 10^5$ **	Dynamique
Cusack-Miller (79)	Tendon de rongeur	5.1	*Brillouin scattering*
Harley *et al.* (1977)	Tendon de rongeur	9.0	*Brillouin scattering*
Hofmann *et al.* (84)	Peau bovine	3.0-5.0	Statique
Nestler *et al.* (1983)	Peau de rongeur	4.1	Dynamique
Nguyen *et al.* (74)	Tendon bovin*	9.0-9.5 **	Dynamique
Sasaki et Odajima (1996a)	Tendon d'achille bovin	2.9±0.1	Statique («*X-ray diffractometry*»)

* Collagène soluble en solution acide et reconstitué à 25°C.
** Module de conservation «élastique» *E'*.

2.1.2.6 Propriétés mécaniques des fibrilles de collagène de type I

Une fibrille combine la rigidité, la résistance à la tension et la flexibilité des câbles toronnés d'acier et constitue la principale source de résistance mécanique chez les tissus conjonctifs (Kadler, 1994).

Similairement à une molécule, la force et l'allongement soumis à une fibrille de collagène peuvent être normalisés (voir §2.3.1) et interpolés par une relation *quasi* Hookéenne (Lanir, 1988; Sasaki et Odajima, 1996b). Toutefois, le module d'élasticité d'une fibrille de collagène est environ dix fois plus faible que celui de la molécule (~0.43 GPa). Par ailleurs, selon Fung (1993), Lanir (1987) et Lapière *et al.* (1988), le module d'élasticité d'une fibrille se rapprocherait plutôt de 1 GPa. Il s'agit d'une relation *quasi* Hookéenne puisque la forme généralement convolutée ou ondulée de la fibrille lui confère une certaine mobilité (Hunter et Finlay, 1973; Lanir, 1979a; Lanir, 1979b; 1988; Lapière *et al.*, 1988; Markenscoff et Yannas, 1979; fig. 29: Millington et Wilkinson, 1983). Les segments de la fibrille composants la forme convolutée ou ondulée, peuvent subir plusieurs rotations avant que la fibrille acquiert une forme parfaitement étirée où celle-ci deviendra «mécaniquement» active (voir figure 2.5). Ces rotations sont grandes en ce qui concerne les fibrilles dermiques (jusqu'à ~40°: Hunter et Finlay, 1973). Cette particularité des fibrilles de collagène se traduit par un taux de force *versus* allongement très faible et ce taux constitue généralement le pied («*toe-part*») de la courbe force *versus* allongement (Lanir, 1988; Markenscoff et Yannas, 1979).

Sur le plan fibrillaire, le rapport d'allongement (~4%) est plus prononcé qu'au niveau moléculaire, environ quatre fois plus élevé (Lanir, 1988; Sasaki et Odajima, 1996b). Cet effet peut s'expliquer par deux mécanismes de déformation (Sasaki et Odajima, 1996b):

i— l'accroissement du pas d'hélice des chaînes α de la molécule;

ii— le réarrangement des molécules de collagène les unes par rapport aux autres.

Il est possible de suivre le réarrangement des molécules en observant la caractéristique striée puisque le mécanisme (*i*) est défini à partir d'un allongement proportionné sur toute la longueur de la fibrille. Selon les mesures de la caractéristique striée ainsi que l'arrangement moléculaire d'Hodge-Petruska, Sasaki et Odajima (1996b) ont démontré une large contribution du mécanisme (*i i*) lors de l'étirement d'une fibrille de collagène.

La résistance mécanique des tissus est évidemment proportionnelle au calibre des fibrilles (*e.g.* tendon vs peau). Selon Lanir (1987), la résistance des fibrilles atteint 150-350·MPa tandis que selon Fung (1993), elle atteint 50-100 MPa. En contrepartie, le calibre des fibrilles est inversement proportionnel à la mobilité du réseau— la capacité du réseau de fibrilles à se réorganiser en utilisant un *minimum* d'énergie suite à un étirement.

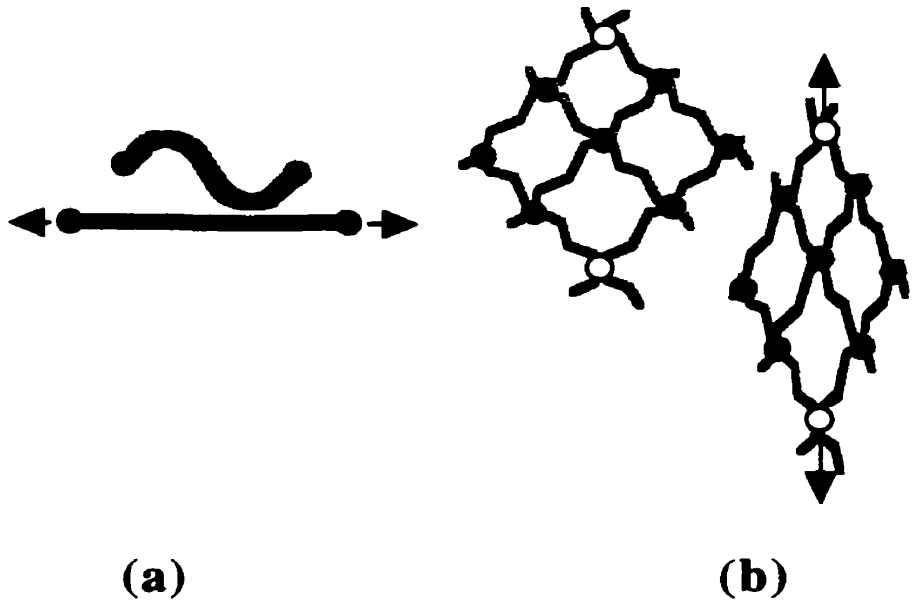


Figure 2.5: Représentation schématique bidimensionnelle des rotations que subissent les fibrilles de collagène du derme. (a) Redressement «défrisage» de la forme convolutée ou ondulée; (b) Effet «ciseau». Viidik (1973). Réticulation entre les fibrilles («*cross-linking*») (●); Noeuds entre les fibrilles (○).

2.1.2.7 Propriétés mécaniques dermiques

Au niveau du tissu dermique, il existe une dispersion des résultats quant aux amplitudes des caractéristiques mécaniques rapportées dans la littérature (voir § 2.2). Le calibre, la densité et la distribution des fibrilles *in vivo* sont définis de manière à répondre spécifiquement à des tractions physiologiques ou externes.

Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, le derme soumis à des tractions affiche un recrutement fibrillaire moins efficace que le tendon: *i.e.* la déformation macroscopique requise afin de

disposer les fibrilles dans une conformation mécaniquement active est plus grande (voir tableau 1 de Markenscoff et Yannas, 1979; Kenedi *et al.*, 1975). Ce recrutement se traduit par une *toe-part* occupant une grande proportion de la courbe normalisée de contrainte *versus* déformation du tissu (voir figure 2.12 et §2.3.2) (Daly, 1982; Gibson *et al.*, 1965; Kenedi *et al.*, 1975; Lanir et Fung, 1974b; Millingtion et Wilkinson).

Du côté de la microstructure, les fibrilles (*i.e.* les segments joignants les réticulations et/ou les noeuds) subissent de grandes rotations dûes aux convolutions et/ou ondulations, et à un effet de «ciseau» permettant ainsi aux fibrilles de s'aligner dans la direction de l'allongement macroscopique (voir figure 2.5) (figure 12 dans Finlay, 1969; Gibson *et al.*, 1965; Viidik, 1973).

À l'état *in vivo*, une des caractéristiques principales du derme humain est son état de tension (Dick, 1951; Dupuytren, 1834; Langer, 1861; Langer, 1862a). Langer (1861) a d'ailleurs défini à l'aide de multiples incisions circulaires sur des cadavres, un schéma de lignes de tension sur tout le corps qui porte aujourd'hui son nom et auquel les plasticiens ont couramment recours. Les plus grandes mesures de tension (par conséquent les mesures d'allongement inclusivement) sont mesurées le long des lignes de Langer (Alexander et Cook, 1977; Ksander *et al.*, 1977; Ridge et Wright, 1966).

Selon Dick (1951) et Lanir (1979a), le maintien de l'état de tension *in vivo* serait imputable aux fibres élastiques formées par la protéine d'élastine (voir § 2.1.3). Toutefois, les forces mécaniques extrinsèques ou intrinsèques aux corps humains sont à l'origine du réarrangement du réseau fibrillaire du derme (Millingtion et Wilkinson, 1983). Par exemple, la distension de la peau abdominale accomode l'expansion du volume occupé par le fœtus vers la fin d'une grossesse. Une telle distension de la peau modifie la distribution des fibrilles de collagène de la peau du site abdominal. Similairement, la distribution des fibrilles sur les membres d'un bébé à la naissance est préférentiellement circonférentielle et celle-ci sera modifiée (surtout aux articulations) vers l'âge de deux ans où les mouvements des enfants deviennent plus énergique (Millingtion et Wilkinson, 1983).

Les effets directionnels (anisotropie) de ces lignes de tension ont été rapportés par plusieurs dont plus particulièrement Langer (1862b) qui fut aussi le premier à décrire une

relation typique de force *versus* allongement de la peau (voir figure 2.12). L'extensibilité du derme, *in vivo* et *in vitro*, particulièrement au niveau de la *toe-part* d'une coube normalisée de contrainte *versus* déformation (figure 2.12), est réduite suivant les directions des lignes de tension de Langer (Gibson *et al.*, 1969; Langer, 1861; Stark, 1977; Wijn, 1980). Par ailleurs, les expériences menées par Lanir et Fung (1974b) et Wijn (1980) ont clairement illustré l'effet d'anisotropie sur l'extensibilité uniaxiale et biaxiale de la peau. Cette perte d'extensibilité suivant les lignes de tension de Langer démontre que les fibrilles subissent beaucoup moins de rotations puisque celles-ci apparaissent préalablement redressées et distribuées parallèlement à ces lignes (Cox, 1941; Millington *et al.* (1971): cités dans Markenscoff et Yannas, 1979; Ridge et Wright, 1966). D'autre part, la rétraction d'une incision linéaire est accrue lorsque l'incision est pratiquée perpendiculairement aux lignes de tension de Langer (Cox, 1942; Ksander *et al.*, 1977).

En ce qui concerne la résistance mécanique tissulaire, les premiers signes de microrupture mécanique d'un réseau de fibrilles surviennent lorsque la traction appliquée surpasse la résistance des fibrilles de plus petit calibre qui unissent généralement celles de plus gros calibre (Lapière *et al.*, 1988). La traction ultime supportée par un réseau de fibrilles est d'une amplitude largement supérieure à celle des microruptures et survient tout juste lorsque les liens entre les fibrilles se rupturent et lorsque les molécules glissent les unes par rapport aux autres (Lapière *et al.*, 1988).

2.1.2.8 Le collagène de type III

La molécule de collagène de type III possède elle aussi une structure triple-hélice. À la différence du type I, elle comprend trois chaînes α d'acides aminés identiques (Uitto et Eisen, 1987). Le collagène de type III qualifié d'«embryonnaire» ou de «vasculaire», entoure les fibres de collagène de type I de gros calibre (Epstein, 1974; Lapière *et al.*, 1988; Wenstrup *et al.*, 1991). Selon Lapière *et al.* (1988), l'implication de ce collagène dans la biomécanique cutanée peut être déduit des observations du syndrome d'Ehlers-Danlos (de type IV) qui correspond à un désordre génétique caractérisé par une réduction de la production de ce collagène. Pour ce syndrome, Holbrook et Byers (1981) ont observé une peau très mince et des vaisseaux sanguins très fragiles.

Les autres types de collagène constituent une faible proportion (voir tableau 2.2) et selon Lapière *et al.* (1988), cette proportion est inférieure à 5%. Ces types collagéniques ont peu d'implication directe sur la mécanique cutanée. Les types IV et VII sont associés à la membrane basale (Millington et Wilkinson, 1983; Uitto et Eisen, 1987; Wenstrup *et al.*, 1991). Le réseau lâche de collagène de type IV constitue des plaques d'ancrage et la couche dense de la membrane basale. Les fibrilles d'ancrage du collagène de type VII accolent la membrane basale à la papille dermique. Une réduction de ces dernières cause la formation mécanique d'ampoules. Par ailleurs, le collagène de type VI apparaît jouer un rôle au niveau des liaisons interfibrillaires et cellules-fibrilles (Lapière *et al.*, 1988). Enfin, les microfibrilles de collagène de type V sont dispersées à l'intérieur des interstices interfibrillaires des fibres de gros calibre (Adachi et Hayashi, 1985). Le rôle de ce type de collagène est peu connu (Uitto et Eisen, 1987).

Sommairement, la combinaison spécifique de plusieurs types de collagène permet de contrôler le calibre des fibrilles et par conséquent, les propriétés mécaniques du derme (Wenstrup *et al.*, 1991).

2.1.3 L'élastine

L'élastine de type I est la seconde plus abondante protéine de la peau (voir tableau 2.1). Cette protéine est une chaîne polypeptidique (acides aminés) possèdant un poids moléculaire approximatif de 70 000 da (Silver, 1987). Cette protéine se lie à des protéines microfibrillaires tubulaires (10-12 nm de diamètre) pour constituer les fibres élastiques de la peau (Ross, 1979: cité dans Millington et Wilkinson, 1983). L'élastine forme le «noyau» amorphe et homogène tandis que les protéines microfibrillaires composent le «cortex» de ces fibres élastiques. Les protéines microfibrillaires ont une influence significative sur l'élastogenèse mais n'apparaissent pas jouer un rôle direct sur les propriétés mécaniques des fibres élastiques (Oxlund *et al.*, 1988; Yahia, 1984).

Deux acides aminés uniques de l'élastine, desmosine et isodesmosine, forment des liens covalents intermoléculaires complexes espacés (3-5 par molécule d'élastine) qui confèrent à l'élastine une stabilité hydrothermique extraordinaire (Oxlund *et al.*, 1988; Wijn, 1980; Yahia, 1984). D'ailleurs, cette molécule réticulée est si stable que maintenue dans des

circonstances «normales», elle demeure dans le corps pendant toute la vie de l'organisme (Fung, 1993).

Selon Yahia (1984), la nature élastique des fibres constituées d'élastine s'explique par l'arrangement structural de l'élastine. Sandberg (1976: cité dans Yahia, 1984) a proposé quatre modèles décrivant cet arrangement :

a— Modèle de chaîne aléatoire;

b— Modèle «*OiledCoil*»;

c— Modèle fibrillaire;

d— Modèle corpusculaire ou de «goutelette liquide».

De plus, l'arrangement structural de l'élastine au niveau des microscopes optique et électronique à balayage, varie d'un tissu à l'autre (Yahia, 1984). Par exemple, l'organisation de l'élastine présente soit des fibres cylindriques (*ligamentum nuchae*), des feuillets (aorte, artère) ou un réseau de mailles lâches (derme, alvéoles polmonaires) (voir figure 2.6).

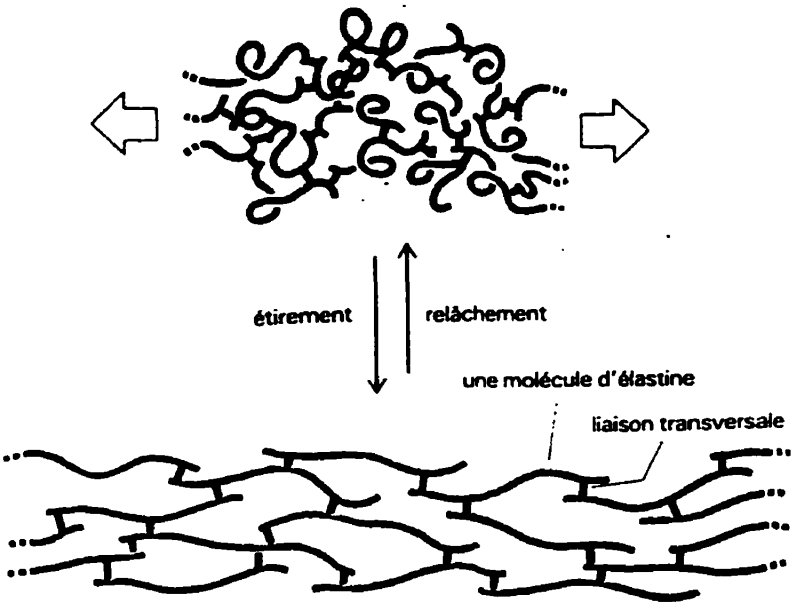


Figure 2.6: Représentation schématique de l'organisation des molécules d'élastine du derme (Alberts *et al.*, 1995). Notes: Les molécules sont unies par des liaisons covalentes desmosine-isodesmosine. Le réseau d'élastine peut s'étirer et se détendre comme les élastomères.

Le nombre, le diamètre, la longueur et l'organisation des fibres élastiques sont influencés par la façon dont les forces mécaniques sont appliquées au derme (Cooper,1969; Sandberg *et al.*, 1981). En conséquence, la distribution des fibres élastiques suit généralement celle des fibrilles de collagène le long des lignes de tension de Langer (Wijn, 1980). Ces fibres élastiques sont enroulées sur les plus grosses structures collagéniques et les annexes du derme.

Lorsque les fibres élastiques et le collagène subissent des ruptures pathologiques (*e.g.* le «*cutis laxa*»), la peau est relâchée et la détente du tissu après étirement est lente (Piérard, 1983; Uitto et Eisen, 1987). Lorsque seul le collagène subit des altérations pathologiques et que le réseau d'élastine n'est pas atteint (*e.g.* le syndrome d'Ehler-Danlos de type I), la peau est mince, hyper-extensible et sa détente après étirement est rapide (Piérard *et al.*, 1983; Uitto et Eisen, 1987). Selon ces observations, le réseau d'élastine assure le maintien et le retour de la forme ondulée des fibres de collagène, et par conséquent, il confère au derme une élasticité «physiologique» (Lapière *et al.*, 1988).

À la façon des élastomères (McCrum *et al.*, 1990), le réseau d'élastine du derme est doté d'un comportement élastique différent des matériaux que l'on connaît, c'est à dire de nature entropique. Ce comportement se traduit de la façon suivante :

I— une hyper-extensibilité générée par de faibles forces;

II— un recouvrement complet de la ou des dimension(s) du réseau suivant sa détente (voir figure 2.6).

L'élastine est la plus «élastique linéaire» des matériaux biosolides connus (Fung, 1993). Étant donné l'amplitude de son taux d'élasticité (voir tableau 2.6), le rôle mécanique de l'élastine du derme est perçu au niveau de faibles charges physiologiques et ne contribue pas à la résistance mécanique du derme (Oxlund *et al.*, 1988).

Selon Jenkins et Little (1974), on peut attribuer cinq rôles biomécaniques au réseau d'élastine:

i— la propagation de déformations originant de sites isolés;

ii— la coordination des mouvements rythmiques des différentes parties du corps;

iii— la conservation d'énergie par un maintien du tonus lors de la relaxation des éléments musculaires;

iv— la défense contre les forces excessives puisque l'élastine forme un réseau continu;

v— la contribution au retour à une configuration non-déformée des organes lors de la cessation de la mise en charge.

Tableau 2.6: Mesures du taux d'élasticité normalisé de l'élastine.

Source	Taux d'élasticité (MPa)	Références
Peau	0.1	Daly (1969)
Ligamentum nuchae‡	0.6	Fung (1993)
Ligamentum nuchae‡	0.3	Kafka (1937)*
Peau	0.2	Lapière *et al.* (1988)
Peau de rongeur	0.24 ±0.07	Oxlund *et al.* (1988)

* Voir références internes de Jenkins et Little (1974).

‡ Ce site anatomique des ruminants contient environ 78% à 83% d'élastine et est à la source de plusieurs travaux de caractérisation de la protéine d'élastine.

2.1.4 Les protéo- et glycosaminoglycannes, et les glycoprotéines

L'ensemble des macromolécules du derme baigne à l'intérieur d'une substance amorphe fondamentale («*ground substance*») qui constitue 70% à 90% du volume de la peau (Lanir, 1987). Cette substance est considérée comme une matrice interfibrillaire visqueuse. Ce sont les glycosaminoglycannes (GAGs) qui donnent une structure à cette substance où a lieu la diffusion (Lapière *et al.*, 1988). Cette substance constitue une forme de réserve pour la peau où l'eau, des métabolites, des électrolytes, de l'urée et des protéines solubles se retrouvent.

Les GAGs de la peau sont formées par la répétition de disaccharides liés entre-eux (voir tableau 2.7) et *in vivo*, les GAGs— à l'exception de l'acide hyaluronique— ne sont pas libres mais liées à une protéine pour constituer une protéoglycanne (PGs) (les *aggrecans* du cartilage constituent un bel exemple de cette structure) (Comper et Laurent, 1978).

Même si les GAGs forment un très faible pourcentage du PTDH, soit moins de 1% (Silver, 1987), les GAGs occupent un grand volume hydrodynamique (voir figure 2.7). En effet, les GAGs sont porteurs de charges négatives qui leurs confèrent ce caractère hydrophile (voir tableau 2.7). Par exemple, l'acide hyaluronique composé de plusieurs disaccharides peut retenir jusqu'à mille fois son propre poids en eau (Comper et Laurent, 1978).

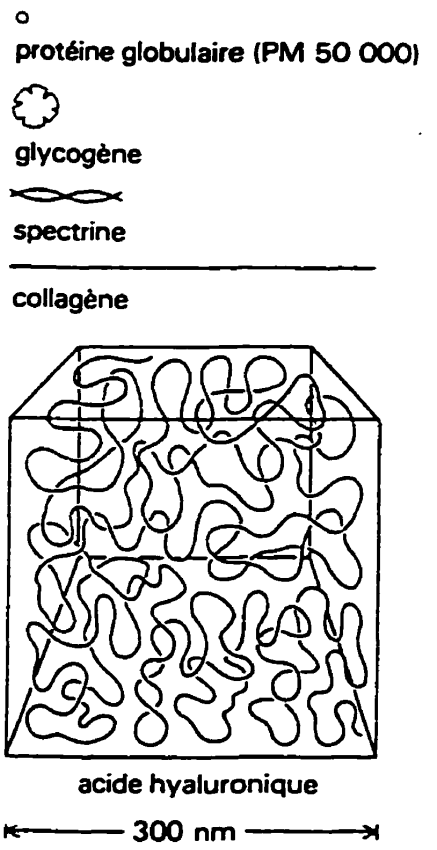


Figure 2.7: Représentation schématique des volumes relatifs de diverses molécules dont le collagène de type I et une molécule hydratée d'acide hyaluronique (Alberts *et al.*, 1995).

Pour le derme, ce caractère hydrophile des GAGs contribue à créer un plus grand volume, à hausser la viscosité (*i.e.* caractère newtonnien) aidant ainsi à la dissipation de l'énergie mécanique, et à donner plus de souplesse. Ces liens avec l'eau sont soit d'hydrogène ou polaire, et limités à 1-2.5 molécules d'eau par disaccharide (Bettelheim *et al.*, 1975). Puisque les disaccharides constituent avec les fibres de collagène deux réseaux interdépendants, l'intégrité du gel ainsi contituée tient d'un équilibre entre la pression osmotique et la contribution élastique des fibres (Comper et Laurent, 1978). La pression osmotique des disaccharides favorise l'imbibition du gel avec de l'eau tandis que les forces élastiques pressent le gel afin d'en extraire l'eau. Cette rétention en eau des GAGs confère au derme une résistance à la compression. Un point commun aux polysaccharides

Tableau 2.7: Caractéristiques physiques des protéo- et glycosaminoglycannes (PGs, GAGs) du derme et de la membrane basale.

Sucre	Sucres du derme (%)	PM/ds. disaccharides	PM/ds. (da)	CN/ds
Acide hyaluronique (GAG)	~55	250-25 000	457	1
Chondroïtine-4-sulfate (PG)	minime	20-60	457	2‡
Chondroïtine-6-sulfate (PG)	minime	20-60	457	2‡
Dematan sulfate (PG)	~44	30-80	457	2‡
Heparan sulfate (PG)	minime	15-30	494	3‡

Poids moléculaire (PM/ds) et charges négatives de chaque disaccharide (CN/ds) établis d'après Alberts *et al.* (1995) et Lodish *et al.* (1995); Pourcentage des sucres du derme d'après Millingtion et Wilkinson (1983).

‡ Dans leur revue (*i.e.* tableau 2), Comper et Laurent (1978) ont rapporté une variabilité de CN/ds due à la teneur en sulfate des disaccharides, tournant autour de cette valeur.

est que leur pression osmotique est extrêmement non-linéaire : *i.e.* une convexité de la courbe pression osmotique *versus* concentration de polysaccharides (voir graphe du modèle d'équilibre de Donnan et de l'équation non-linéaire de Poisson-Boltzmann dans Buschmann et Grodzinsky, 1995; voir figure 6 dans Comper et Laurent, 1978).

Concernant les interactions GAGs-GAGs, une hausse de la concentration en GAGs comme l'acide hyaluronique accroît l'élasticité (*i.e.* caractère non-newtonnien) du derme. L'enchevêtrement de l'acide hyaluronique ainsi que des liens d'hydrogène est à l'origine de cette hausse d'élasticité (Comper et Laurent, 1978).

Dans les interactions GAGs-protéine du derme, des liens électro-chimiques peuvent induire des changements dans la conformation des protéines. Ces liens électro-chimiques se produisent entre les GAGs négativement chargées et les protéines positivement chargées— la plupart des protéines (Comper et Laurent, 1978). Par exemple, le *dermatan sulfate* plus particulièrement, se lie aux fibres de collagène (un *maximum* de 2-4 disaccharides par molécule de collagène) et peut jouer un rôle dans la formation de liens collagéniques interfibrillaires (Comper et Laurent, 1978; Scott, 1984). La compréhension de ces interactions n'est pas si simple puisqu'il existe d'autres paramètres qui jouent aussi un rôle déterminant dans le maintien de ces liaisons : *i.e.* le milieu ionique, la densité des charges, le poids moléculaire des disaccharides.

Dans l'espace péri-cellulaire, on retrouve des glycoprotéines de structure dont principalement la fibronectine. Cette petite protéine possède une forme en "V" à angle de 70° dont les deux bras ont une longueur de 61 nm et une profondeur de 2 nm (Silver, 1987). La fibronectine peut jouer un rôle au niveau des interactions cellules-fibrilles (Mosher et Furcht, 1981). Dans cet espace, on retrouve aussi des GAGs, e.g. l'*heparan sulfate* , possédant le même potentiel de mécano-transduction (Woods *et al.*, 1985). Les interactions cellule-matrice jouent un rôle significatif lors de la transmission de *stimuli* mécaniques vers la cellule, régulant ainsi l'activité de biosynthèse du tissu cutané (Nusgens *et al.*, 1984).

D'autre part, on retrouve dans le derme une protéine, la réticuline, difficilement identifiable puisqu'elle possède sensiblement la même composition chimique et périodicité que le collagène (Montagna et Parakkal, 1974). De plus, elle est intimement liée au collagène et elle est située près des annexes du derme. Sa faible proportion (0.4% de cette glycoprotéine dans un derme déshydraté) en fait un élément structural possédant un rôle biomécanique relativement négligeable.

Au niveau de la couche basale, on retrouve une autre glycoprotéine : la laminine. Celle-ci a la forme d'une croix munie de trois courts segments (35 nm) et d'un autre plus long (75 nm) (Silver, 1987). Cette protéine sert à unir la couche basale de l'épiderme à la couche dense sous-jacente composée de collagène de type IV.

2.1.5 Le *stratum corneum*

Le rôle principale des kératinocytes[8] consiste à produire de la kératine (Alberts *et al.*, 1995). À mesure qu'ils s'éloignent de la couche basale, les kératines structurent les kératinocytes et ceux-ci se transforment; ils s'aplatissent, perdent leur noyau et meurent pour former des squames ou cornéocytes constituant ainsi le *stratum corneum* (figure 2.8). Cette couche de cellules mortes et rigides est la première à recevoir les forces mécaniques appliquées au corps et constitue une forme de bouclier aux cellules vivantes sous-jacentes.

Le *stratum corneum* constitue un ensemble hétérogène et contient approximativement 40% de protéines, 40% d'eau et 20% de lipides (Elias, 1983). En pourcentage de tissu déshydraté, ce *stratum corneum* renferme 60% de kératines, 15% de lipides, 15% de protéines amorphes et 10% de substances à faible poids moléculaire (Lévêque et Rasseneur, 1988). Selon l'analogie d'Elias (1983), le *stratum corneum* est un système à deux compartiments dans lequel les cellules sont des «briques» protéiques et des *lamellae* lipidiques intercellulaires forment le «mortier» intercellulaire.

Les liens entre les cornéocytes sont assurés par les desmosomes ponctuels[9], des zones spécialisées de la membrane cellulaire (voir figures 2.9 et 2.10). Il est admis que les desmosomes ponctuels sont les structures qui donnent une cohésion aux *épithélia* (Koutroupi et Barbenel, 1990; Lévêque *et al.*, 1988; Lodish *et al.*, 1995; Millington et Wilkinson, 1983; Wildnauer *et al.*, 1971). Un desmosome ponctuel consiste en des plaques d'adhésion protéiques cytoplasmiques (15-20 mm d'épaisseur) attachées aux membranes cytoplasmiques (dans l'espace intracellulaire) et reliées entre-elles par des protéines liantes transmembranaires (filaments intercellulaires) (figures 2.9 et 2.10) (Lodish *et al.*, 1995). D'une part, les plaques cytoplasmiques sont constituées de

---

8 De *kéras* qui désigne corne.

9 Par analogie, on associe les desmosomes ponctuels aux «boutons pressions».

plakoglobin qui forment un réseau très dense. D'autre part, les filaments intercellulaires sont constitués de *desmoglein* et de *desmocollin*. La *desmoglein* (une glycoprotéine de ~750 acides aminés) a été révélée pour la première fois lorsque les cliniciens ont identifié une pathologie cutanée inhabituelle, *pemphigus vulgaris* (Lodish *et al.*, 1995). Cette maladie auto-immune visant la *desmoglein*, provoque une perte de cohésion entre les kératinocytes et par conséquent, des gerçures à la peau. De plus, lors de la desquamation (*i.e.* sous l'influence de signaux connus et inconnus, les cornéocytes se détachent de l'épiderme de façon quotidienne), une intervention enzymatique sur ces filaments intercellulaires cause l'altération des desmosomes ponctuels (Fartasch *et al.*, 1983: cités dans Michel, 1995).

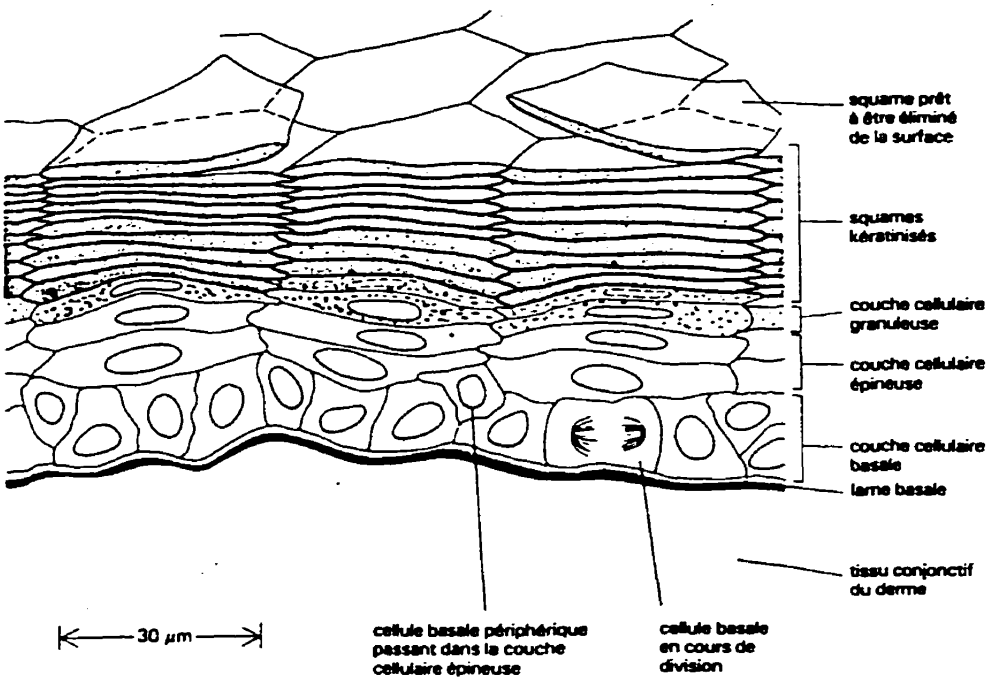


Figure 2.8: Représentation schématique de la vue en coupe de l'épiderme (Alberts *et al.*, 1995).
Notes : Les kératinocytes de la couche cellulaire basale au *stratum corneum*, sont organisés en colonne telle que proposée par l'«*epidermal proliferating unit*» (Millingtion et Wilkinson, 1983). Cette organisation structurale est principalement observée chez la souris; chez l'humain, quelques rares sites anatomiques possèdent cette structure en colonne. Les squames kératinisés (cornéocytes) jouent un rôle mécanique clé lorsque l'épiderme est soumis à des forces puisqu'ils protègent les couches cellulaires sous-jacentes.

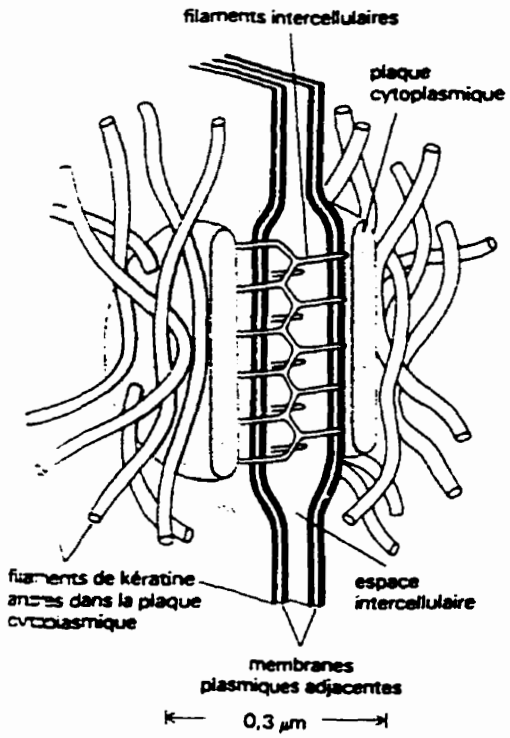
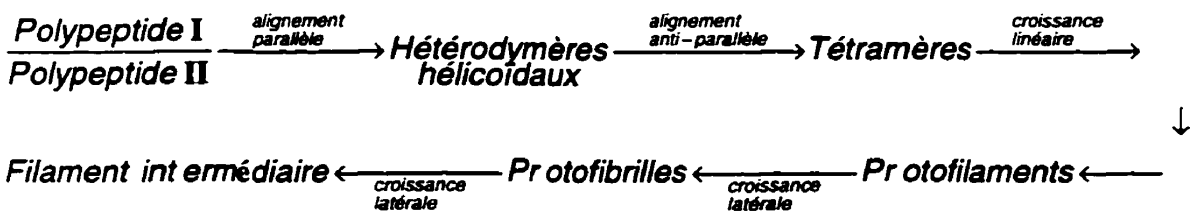


Figure 2.9: Représentation schématique d'un desmosome ponctuel (Alberts *et al.*, 1995).
Notes : La plaque cytoplasmique est constituée de *plakoglobin* tandis que les filaments intercellulaires sont formés de *desmoglein* et *desmocollin* (Lodish *et al.*, 1995). Les desmosomes ponctuels assurent la cohésion de l'épiderme.

Au niveau mécanique, peu de données sont rapportées concernant la qualité mécanique des desmosomes ponctuels du *stratum corneum*. Lévêque *et al.* ont rapporté en 1988 une résistance mécanique approximative de 19 dynes bien que Lévêque *et al.* aient admis que certains desmosomes se soient rupturés sans aucune force mesurable.

À l'intérieur de kératinocytes, des filaments intermédiaires (kératines) sont ancrés dans la plaque cytoplasmique (voir figures 2.9 et 2.10). Les sous-unités protéiques des filaments intermédaires possèdent une structure similaire (pour revue: 1109-1110 de Lodish *et al.*, 1995). L'assemblage des filaments est un processus dynamique de sous-unités polypeptidiques de kératines de types I et II correspondant respectivement aux kératines 1 et 10 pour le *stratum corneum* (pour revue: Michel, 1995). Ces filaments intermédiaires de 10 nm de diamètre formés de structures hétérodymères hélicoïdales, sont assemblés selon la séquence suivante :



Selon Matolsty (1976 : cité dans Rasseneur *et al.*, 1982), ces filaments de kératines constituent 50% de la cellule et sont inclus dans une phase amorphe riche en soufre. De plus, à l'intérieur de cette phase amorphe cytoplasmique, baignent des «*natural moisturizing factors*» responsables de la fixation de l'eau et conséquement, des propriétés mécaniques des cornéocytes (Middleton, 1968). Parmi les filaments de kératines, certains sillonnent parallèlement la membrane cellulaire et d'autres en racourci traversent le cytoplasme (voir figure 2.10). Généralement, pour des structures kératinisées (*e.g.* cheveux, *stratum corneum*) baignant dans l'eau, l'élasticité est directement reliee à la concentration de cystéine (*i.e.* présence de liens disulfures) (voir revue de Lévêque *et al.*, 1988). Comme la membrane du cornéocyte est 2.4 fois plus riche en cystéine que le *stratum corneum*, la membrane apparaît jouer un rôle mécanique fondamental. La densité des kératines du cytoplasme donne donc à la cellule une forme et une grande rigidité. Suivant ce réseau intracellulaire de kératines, les desmosomes ponctuels assurent la transmission de forces d'une couche de l'*épithélium* à une autre.

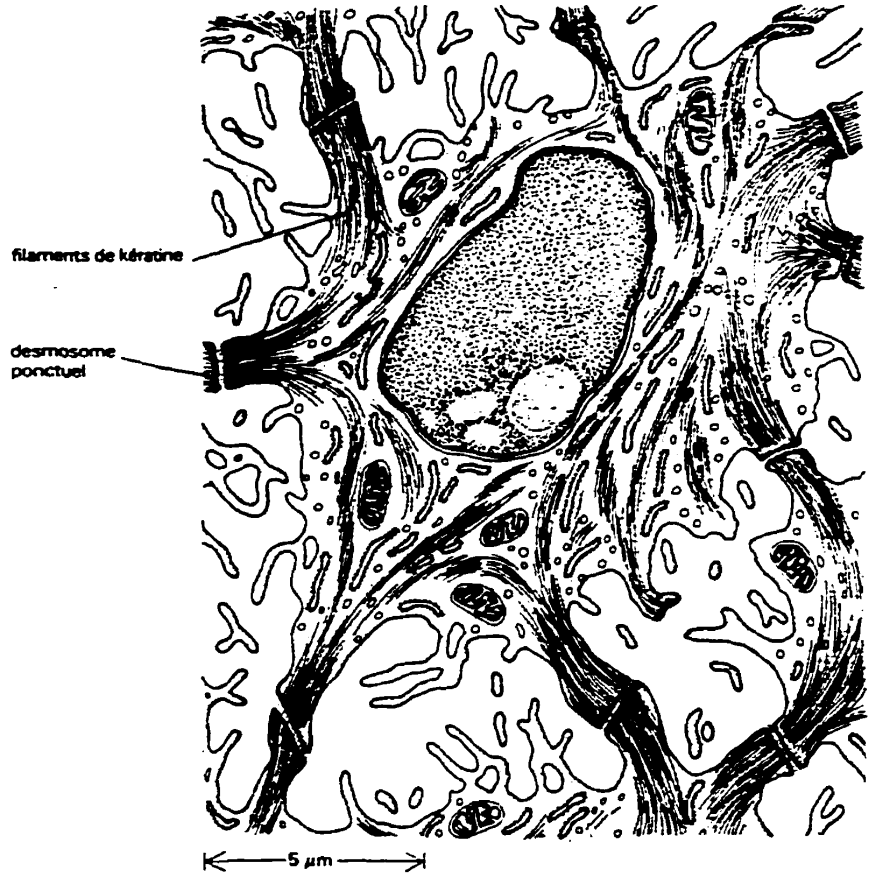


Figure 2.10: Représentation schématique de la vue en coupe d'un kératinocyte de la couche épineuse de l'épiderme (Alberts *et al.*, 1995). Notes : Des faisceaux de filaments de kératine commencent à sillonner parallèlement la membrane cellulaire. Les desmosomes ponctuels «boutons pressions» assurent la cohésion entre les kératinocytes.

Selon Millington et Wilkinson (1983), la forme optimale des cornéocytes est ellipsoïdale; cependant les deux axes qui caractérisent cette forme varient selon plusieurs facteurs. De plus, l'épaisseur des kératinocytes est d'approximativement 0.3 µm (Plewig *et al.*, 1983: cités dans Lévêque *et al.*, 1988). L'empilement en colonne des cornéocytes tel que proposé par l'«*epidermal proliferating unit*» (figure 2.8), est relié au taux de mitoses des kératinocytes (Bergstresser et Chapman, 1980: cités dans Millingtion et Wilkinson, 1983). Chez l'humain, plusieurs facteurs influencent ce taux : le nettoyage, l'abrasion et d'autres activités normales. Ce même taux est possiblement trop élevé pour favoriser

l'empilement en colonne. Aucune expérience jusqu'à ce jour a démontré l'influence de cette distribution en colonne sur les propriétés mécaniques du *stratum corneum*.

Des expériences de Lévêque *et al.* (1988) menées au moyen de micromanipulateur avec 100% d'humidité relative, ont permis d'observer deux traits importants des cornéocytes :

i— les cornéocytes se plient facilement : ceux-ci ont un comportement membranaire puisqu'ils offrent très peu de résistance à la flexion.

ii— les cornéocytes (leur membrane) possédent une ridigité de 450 MPa en traction avec (20% d'erreur relative).

Le taux d'élasticité rapporté par Lévêque *et al.* (1988) est largement supérieur aux taux d'élasticité rapportés pour le *stratum corneum* , par exemple : 5 MPa (Park et Baddiel, 1972). Selon les données rapportées par ces investigateurs, on peut estimer l'allongement des cornéocytes avant rupture des desmosomes ponctuels à 28%. En conséquence, l'alongement du *stratum corneum in vivo* ne résulterait pas seulement de l'allongement propre des cornéocytes mais en grande partie d'un changement de conformation des plis épidermiques constitués par les cornéocytes.

À l'échelle macroscopique, le *stratum corneum* soumis à des tractions affiche un recrutement progressif de ses composantes. L'ensemble des composantes du *stratum corneum* présente un comportement en traction constitué de quatre parties. La partie (I') non-représentée sur la courbe typique de force *versus* allongement de Wildnauer *et al.* (1971) (voir figure 2.11a), est une *toe-part* (similaire à celle dermique voir §2.3.2 et figure 2.12) correspondant à une sorte de «défrisage» macroscopique de la structure (Lévêque *et al.*, 1988; Rasseneur *et al.*, 1982). À l'état *in vitro*, cette partie est généralement absente puisque le *stratum corneum* est préalablement soutenu par un faible niveau de tension. En conséquence, il n'existe pas de valeur d'allongement caractérisant cette *toe-part*. La partie (I) est élastique et linéaire; le taux d'élasticité du *stratum corneum* y est calculé. Celle-ci met en évidence le recrutement des kératines et le déroulement des chaînes α des kératines en chaîne β[10] (Rasseneur *et al.*, 1982; Wildnauer *et al.*, 1971). La partie (II) est un plateau qui correspond à la partie d'écoulement; celle-ci est due à la rupture consécutive des liaisons inter et intrachaînes des kératines suivant le déroulement des chaînes α. Finalement, la partie (III) qui est un redressement de la courbe force

---

10 Arrangement qui défini un polypeptide allongé

versus allongement, représente la partie post-écoulement où le taux d'élasticité linéaire pourrait correspondre au taux d'élasticité des chaînes β de kératines (Rasseneur *et al.*, 1982).

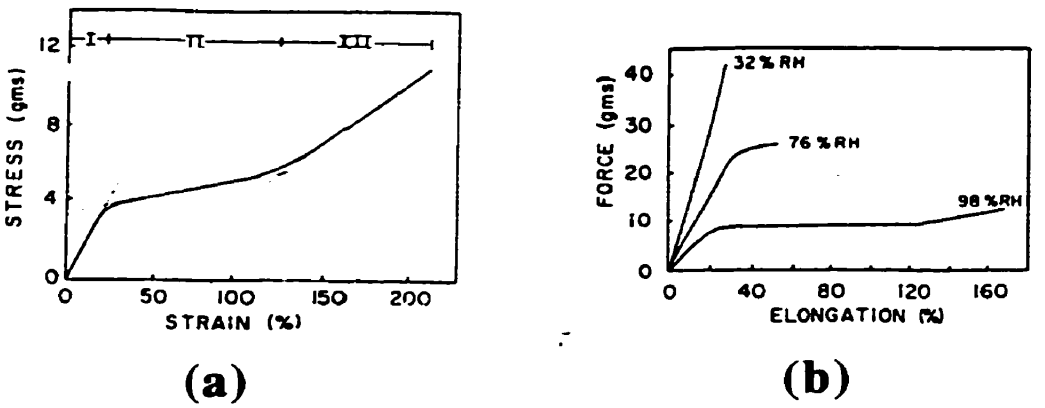


Figure 2.11: Courbes de force *versus* allongement du *stratum corneum* (Wildnauer *et al.*, 1971). (a) Courbe typique; (b) Courbes *versus* humidité relative (RH). (I) Partie linéaire élastique; (II) Partie d'écoulement; (III) Partie post-écoulement. Note: La *toe-part* (I') précédant (I) et correspondant au défrisage macroscopique du *stratum corneum* n'est pas représentée sur ces courbes.

Tel que l'affiche la figure 2.11b, le contenu en eau influence grandement la performance mécanique du *stratum corneum*. L'hydratation du *stratum corneum* accroît son allongement à la rupture (jusqu'à 200 %; Wildnauer *et al.*, 1971) tandis qu'elle abaisse sa résistance à la rupture (jusqu'à 5 fois; Wildnauer *et al.*, 1971) et son élasticité (jusqu'à 10^3 fois; Park et Baddiel, 1972). Blank (1952) fut le premier à reconnaître qualitativement que le contenu en eau, et non pas celui lipidique, est l'effecteur primaire de la flexibilité du *stratum corneum* :

«*The conified epithelium becomes soft and pliable when a moisture content of about 10 mg/100 mg dry weight is reached; this corresponds to relative humidity of about 60%*».

Les observations de Blank ont profondément changé la pensée des dermatologistes et cosmétologues concernant les facteurs qui influencent la souplesse de la peau. Plusieurs *natural moisturizing factors* interagissent avec l'eau à l'intérieur des cornéocytes (Lapière et Rasseneur, 1988; Middleton, 1968). L'eau hygroscopiquement liée à ces agents agirait comme plastifiant[11] des protéines du *stratum corneum* qui sont responsables de son

---

11 Au sens chimique, des agents qui réduisent les interactions entre les chaînes; par exemple, par la formation de liens hydrogènes avec les groupes peptidiques.

intégrité mécanique. En absence de cette eau, le réseau de filaments de kératine devient plus compact et les interactions protéine-protéine sont multipliées accroissant ainsi le taux d'élasticité du *stratum corneum* (Lapière et Rasseneur, 1988; Park et Baddiel, 1972).

De plus, l'hydratation du *stratum corneum* induit une composante visqueuse additionnelle dans la réponse mécanique (Christensen *et al.*, 1977; Rasseneur *et al.*, 1982). Selon Rasseneur *et al.* (1982), cette dissipation d'énergie serait reliée à la réorganisation des liaisons transversales des kératines *via* le déplacement de leurs points d'application.

À l'état *in vivo*, bien que le contenu du *stratum corneum* soit élaboré de façon à répondre spécifiquement à des forces physiologiques ou externes, il existe très peu d'études qui aient considérées les effets directionnels des lignes de tension de Langer sur la couche cornée. Selon Koutroupi et Barbenel (1990), le *stratum corneum* se comporte en tension comme une membrane isotropique mais leur conclusion ne repose que sur des orientations caudocranien et médiolatéral cranien.

2.2 Méthodes de mesure des propriétés biomécaniques de la peau

Une procédure «idéale» devrait consister en des tests multiaxiaux *in vivo* utilisant des champs de déformations unifomes, telles que des propriétés biomécaniques cutanées normalisées puissent être directement associées aux résultats de ces tests (Lanir, 1987). À ce jour, il n'existe pas de procédure pareille.

C'est le baron Dupuytren (1834) qui dans l'histoire utilisa la première méthode de mesure des propriétés biomécaniques de la peau. À la suite d'une tentative de suicide d'un de ses patients, le baron Dupuytren put apporter des clarifications importantes concernant les agissements de son patient. À l'aide de perforations pratiquées sur des cadavres, Dupuytren fut le premier à soutenir l'assertion de tension cutanée impliquant des effets directionnels. Malgaigne en 1859 (cité dans Langer, 1861) confirma par la suite cette assertion en utilisant la même méthode sans pouvoir établir de règle générale à propos des «fibres» de la peau. Deux années plus tard, Langer (1861; 1862a) réussit là où Malgaigne avait échoué et constitua à partir de cette méthode de perforation un réseau de lignes de tension cutanée qui portent d'ailleurs son nom. Celui-ci fut aussi le premier à expliquer le comportement élastique de la peau en traction uniaxiale *in vitro* (Langer, 1862b) et à

l'associer à la structure des «fibres» cutanées. Suivant les expériences de Langer, il s'est écoulé un siècle sans qu'il y ait de publication décrivant de nouvelles méthodes et expériences sur ce sujet.

Les trois prochaines sous-sections présentent une synthèse des différentes méthodes d'évaluation *in vivo* comme *in vitro*. La revue de ces méthodes révèle principalement l'utilisation de deux types de *stimulus* mécanique: normal à la peau (*e.g.* adhérence ou «*pull out*», ballistométrie, compression, perforation, succion) et parallèle à la peau (*e.g.* friction, traction, torsion, mouvement ondulatoire). Relativement à ces *stimuli*, deux autres sous-catégories sont proposées: soit celle «statique» (ou quasi-statique) et celle «dynamique». Les *stimuli* statiques supposent un équilibre des forces et par opposition, ceux dynamiques supposent leur évolution dans le temps.

2.2.1 Méthodes d'évaluation *in vivo*

Certainement le plus simple et le plus répandu des tests sur les matériaux, le test de traction uniaxiale (voir tableau 2.8) rapporte des mesures de tension et d'allongement. Les instruments permettant ces mesures sont généralement des extensomètres; ceux-ci sont fixés à la peau au moyen d'appuis et d'adhésifs. Ces tests ont contribué en grande partie à détailler la structure du collagène, l'anisotropie cutanée, l'élasticité et la viscoélasticité de la peau. La relation tension *versus* allongement permet de détecter plusieurs propriétés mécaniques cutanées. Toutefois, lorsque la distance séparant les appuis devient petite relativement à leur profondeur, ce test devient un mode de stimulation biaxiale (Marks, 1991).

Comme le test de traction uniaxiale ne tient pas compte de l'effet des tissus environnants, des chercheurs ont élaboré des tests de traction biaxiale à l'aide d'extensomètres croisés (Wan Abas, 1994) et de techniques d'aspiration dites tests de succion (voir tableau 2.9). Il est d'ailleurs admis qu'une fonction primaire de la peau est de supporter des tractions biaxiales; ne l'oublions pas. Les mesures de forces et d'allongements rapportées lors d'un test biaxial sont associées à l'élasticité de la peau ainsi qu'à l'écoulement du fluide de

Tableau 2.8: Tests de traction uniaxiale réalisés *in vivo* sur de la peau humaine. Étude statique (S); Étude dynamique (D).

Auteurs	Catégorie	Études
Gibson *et al.* (1965)	S	Microstructure du collagène
Kenedi *et al.* (1965)†	S	Réponse *in vivo versus in vitro*
Gibson *et al.* (1969)	S	Effets directionnels de la peau
Allaire *et al.* (1977)†	S	Analyse de l'énergie de déformation
Burlin *et al.* (1977)	S	Effets de la radiothérapie
Christensen *et al.* (1977)	D	Réponse *in vivo versus in vitro* du *stratum corneum*; *stimulus* sinusoïdal
Stark *et al.* (1977)	S	Effets directionnels de la peau
Wijn (1980)	D	Effets de l'élastine; anisotropie cutanée
Vogel (1982)	S	Réponse *in vivo versus in vitro*; Veillissement
Wan Abas *et al.* (1982)	S	Inhomogénéité des déformations
Gunner *et al.* (1984)	S, D	Élasticité, relaxation; détente
Marks *et al.* (1985)‡	S	Forces de déplissage cutané; *Turgometer*
Manschot-Brakkee (86)	S, D	Effets dimensionnels des appuis; fluage
Clark *et al.* (1987)	S	Effets de l'hypertrophie cutanée chez les brûlés
Wan Abas (1994)	S, D	Réponse de *stimuli* uniaxial *versus* biaxiale; relaxation

† Cités dans Lanir (1987); * Tests réalisés sur des rongeurs; ‡ Cités dans Marks (1991).

la matrice dermique, rendant ainsi l'interprétation des données plus difficile. Depuis 1990, l'application du test de succion au moyen d'une ouverture concave hémisphérique a mené au développement de deux produits commerciaux, soit le *Cutometer* SM 474® (Cua *et al.*, 1990) largement utilisé par Piérard et ses collaborateurs (Liège, Belgique), et le *Dermaflex*® (Jemec *et al.*, 1990).

Tableau 2.9: Tests de succion réalisés *in vivo* sur de la peau humaine. Étude statique (S); Étude dynamique (D).

Auteurs	Catégorie	Études
Dick (1951)	S	Amplitude des tensions *in vivo*
Tregear (1966)‡	S	Élasticité de la peau
Grahame (1970)	S	Effets de l'âge, du sexe et de la grossesse
Alexander et Cook (77)	S	Effets de l'état de tension cutanée *in vivo*
Cook *et al.* (1977)	S	Effets de l'état de tension cutanée *in vivo*
Cua *et al.* (1990)	D	Appareil *Cutometer* SM 474® (Courage Khazaka, Allemagne); effets de l'âge, du sexe et des sites anatomiques.
Jemec *et al.* (1990)	D	Appareil *Dermaflex*® (Cortex Tech. Aps, Danmark); hydratation superficielle; hystérésis
Overgaard Olsen *et al.* (1993)	D	Effets d'émollients et d'hydratants; hystérésis; usage du *Dermaflex*®
Takema *et al.* (1994)	D	Effet de l'âge; fluage; usage du *Cutometer* SM 474®
Viatour *et al.* (1995)	D	Effets du site anatomique; fluages (3); usage du *Cutometer* SM 474®
Piérard *et al.* (1995)	D	Effets de la surface testée; fluages (3); usage du *Cutometer* SM 474®
Piérard *et al.* (1995)	D	Effets de l'hormonothérapie; fluages (3); usage du *Cutometer* SM 474®
Nikikels-Tassoudji *et al.* (1996)	D	Effets du diabète; fluage (3); usage du *Cutometer* SM 474®

‡ Cités dans Marks (1991).

Par ailleurs, d'autres chercheurs ont développé un test de torsion (voir tableau 2.10). Ce test relativement simple rapporte des mesures de couple et d'angles de rotation. L'instrument permettant ces mesures est un module capteur de couple-disque; le disque

est fixé à la peau au moyen d'adhésif et un anneau de garde ancre la peau environnante. Ces tests pratiqués essentiellement sur les avant-bras, ont contribué en grande partie à détailler les propriétés viscoélastiques de la peau (i.e. fluage et/ou relaxation). Depuis 1985, l'application du test de torsion a mené au développement d'au moins deux produits commerciaux, soit le *Twistometer*® (L'Oréal, France) et le DTM*Torque Meter*® (Dia-Stron, UK).

Tableau 2.10: Tests de torsion réalisés *in vivo* sur de la peau humaine. Étude statique (S); Étude Dynamique (D).

Auteurs	Catégorie	Études
Vlasblom (1967)‡	D	Effets de l'acide hyaluronique sur le fluage
Finlay (1970)	D	Relaxation; *stimulus* sinusoïdal
Barbenel et Evans (77)	D	Relaxation; *stimulus* sinusoïdal
Agache *et al.* (1980)	D	Ajout de l'anneau de garde; module d'Young de la peau
Wijn (1980)	D	Effets de l'élastine; anisotropie cutanée
de Rigal et Lévêque (85)	D	Appareil *Twistometer*® (L'Oréal, France)
Bramont *et al.* (1987)‡	D	Effets des syndromes de Marfan et Ehlers-Danlos
Escoffier *et al.* (1989)	D	Veillissement; usage du*Twistometer*®
Berardesca *et al.* (1991)	D	Races; usage du*Twistometer*®
Salter et al. (1993)	D	Effets de l'âge, du sexe et de l'hydratation; usage du *Torque Meter*® (Dia-Stron, UK)

‡ Cités dans Marks (1991).

2.2.2 Méthodes d'évaluation *in vitro*

Si plusieurs chercheurs se sont tourné vers des méthodes d'évaluation *in vitro*, c'est que celles-ci permettent de décrire des propriétés irréversibles, d'utiliser des méthodes purement invasives (*e.g.* digestion enzymatique) afin de faire le point sur la microstructure cutanée et de produire des évaluations de longues durées. Ces méthodes sont cependant à la merci de plusieurs facteurs (voir §2.2.4) et quoique l'on puisse

soutirer des résultats similaires aux méthodes produites *in vivo* (Vogel, 1982), la réponse mécanique *in vitro* diffère de celle *in vivo* (Christensen *et al.*, 1977).

L'évaluation *in vitro* de spécimens cutanés est généralement réalisée à partir de tests de traction (voir tableau 2.11) suivis d'analyses histologiques. Les instruments permettant ces mesures sont généralement des machines de traction commerciales (*e.g. Instron®*) et des pinces spécifiquement adaptées aux spécimens cutanés. Dans l'ensemble, ces tests sont produits sur des explants de cadavres, post-chirurgicaux ou de modèles animaux. Chez les modèles animaux, il est admis que la peau porcine représente un excellent modèle cutané selon différents points, tel que sa vascularisation, son épiderme et sa papille dermique (Chvapil *et al.*, 1987; Robinson *et al.*, 1987).

Par ailleurs, deux laboratoires français ont développé une méthode d'évaluation *in vitro* basée sur des tests de taction uniaxiale de «dermes équivalents» (Chapuis et Agache, 1992; Delvoye *et al.*, 1991). Cependant, les géométries présentées par ces dermes équivalents induisent d'une part pour le modèle de Delvoye *et al.* (1991), des contractions inappropriées et d'autre part pour le modèle de Chapuis et Agache (1992), une distribution collagénique inadaptée aux besoins cliniques.

Tableau 2.11: Tests de traction uniaxiale réalisés *in vitro* sur de la peau. Étude statique (S); Étude dynamique (D). Modèles félins (f); humains (h); lagomorphes (l); porcins (p); rongeurs (r); derme équivalent (DE).

Auteurs	Catégorie	Études
Langer (1862b)	S (h)	Élasticité de la peau
Glaser *et al.* (1965)†	S (p)	Élasticité de la peau
Ridge et Wright (1966)	S (h)	Évaluation des lignes de tension de Langer
Kenedi *et al.* (1966)	S, D (h)	Élasticité et relaxation de la peau
Jamison *et al.* (1968)	D (p)	Fluage (étude phénoménologique)
Daly (1969)	S (h)	Effet de l'élastine sur l'élasticité
Finlay (1969)	S (h)	Microstructure du derme sous traction
Elden (1970)†	S (f)	Élasticité d'un spécimen annulaire (queue)
Veronda-Westmann (70)	S (f)	Analyse de l'énergie de déformation

† Cités dans Lanir (1987).

Tableau 2.11 : Tests de traction uniaxiale réalisés *in vitro* sur de la peau. Étude statique (S); Étude dynamique (D). Modèles félins (f); humains (h); lagomorphes (l); porcins (p); rongeurs (r); derme équivalent (de). (Suite)

Auteurs	Catégorie	Études
Wildnauer *et al.* (1971)	S (h)	Élasticité du *stratum corneum*; hydratation
Park et Baddiel (1972)	S (h)	Élasticité du *stratum corneum*; hydratation
Brown (1973)	S (h)	Microstructure du derme sous traction
Wilkes et Wildnauer (73)	D (h, r)	Viscoélasticité du *stratum corneum*
Lanir et Fung (1974ab)	S (l)	Réponses de *stimuli* uniaxiaux *versus* biaxiaux
Kenedi *et al.* (1975)	S (h)	Préconditionnement de la peau
Lanir (1976)	D (l)	Réponses de *stimuli* uniaxiaux *versus* biaxiaux; relaxation
Daly (1982)	S, D (h)	Élasticité; relaxation; microstructure
Rasseneur *et al.* (1982)	S, D (h)	Relaxation; *stimulus* sinusoïdal du *stratum corneum*
Vogel (1987a; 1987b)	S, D (h)	Veillissement; élasticité; microstructure; hystérésis; fluage; relaxation
Lévêque *et al.* (1988)	S (h)	Élasticité des corméocytes
Oxlund *et al.* (1988)	D (r)	Rôle de l'élastine; fluage
Koutroupi *et al.* (1990)	S (h)	Élasticité; rupture du *stratum corneum*
Delvoye *et al.* (1991)	S, D (DÉ)	Élasticité, relaxation
Belkoff et Haut (1991)	S (r)	Élasticité, validation d'un modèle structurel
Quirinia et Viidik (1991)	S (r)	Influence de la congélation
Chapuis et Agache (92)	S (DÉ)	Élasticité d'un spécimen annulaire
Jørgensen *et al.* (1993)	S (r)	Propriétés mécaniques des greffes cutanées
Mansour *et al.* (1993)	D (l, p)	Effets des manipulations du spécimen

† Cités dans Lanir (1987).

Si les tests de traction uniaxiale présentent l'avantage d'être soustraits à des effets difficiles à interpréter comme ceux causés par les tissus environnants, en contrepartie, ils ne constituent pas une représentation très exacte de la peau subissant de grandes

déformations. Les données issues des tests de traction uniaxiale ne peuvent être généralisées afin de supporter les équations constitutives tridimensionnelles (Humphrey *et al.*, 1987; Tong et Fung, 1976). Par contre pour les tissus incompressibles, les tests de traction biaxiale conviennent à l'identification de ces équations. Cependant, l'élaboration de méthodes d'évaluation biaxiale *in vitro* constitue un grand défi (Lanir et Fung, 1974a) et plusieurs questions demeurent sans réponse concernant: i) l'homogénéité des déformations, ii) l'absence de cisaillement, et iii) un compromis entre une valeur moyenne et une estimation plus précise de déformation (Humphrey *et al.*, 1987). D'ailleurs, un nombre limité d'investigateurs ont jeté leur dévolu sur des tests de traction biaxiale *in vitro* (voir tableau 2.12). En rançon, les données des tests de tractions biaxiales fournissent un champ beaucoup plus étendu d'informations qui concerne directement la fonction mécanique cutanée.

Tableau 2.12: Tests de traction biaxiale réalisés *in vitro* sur des tissus mous membranaires.

Auteurs	Tissu mou membranaire	Imagerie-Instrumentation
Lanir et Fung (1974a)	Peau	*Video-Dimension Analyzer**
Vawter *et al.* (1978)	Parenchyme pulmonaire	*Video-Dimension Analyzer**
Vito (1980)	Péricarde	*Charged Coupled Devices*
Schneider (1982)[∞]	Peau	*Video-Dimension Analyzer**
Demer et Yin (1983)[¶]	Myocarde	*Video-Dimension Analyzer**
Lee *et al.* (1985)[¶]	Péricarde	*Video-Dimension Analyzer**
Chew *et al.* (1986)[¶]	Péricarde	*Video-Dimension Analyzer**
Humphrey *et al.* (1987)	Plèvre viscérale	Système *Vidicon*
Choi et Vito (1990)	Péricarde	Système *Vidicon*
Sacks et Chuong (1993)	Myocarde	Deux caméras *EG&G*

[¶] Cités dans Humphrey *et al.* (1987); [∞] Cités dans Schoemaker *et al.* (1986); * Yin *et al.* (1972).

L'instrumentation originale développée par Lanir et Fung (1974a), le *Two-dimensional Biodyane*, représente bien les types de systèmes permettant les mesures de traction biaxiale, et a donné lieu à l'élaboration d'instrumentation du même genre: *e.g.* le *Triax* (Vawter *et al.*, 1978). Brièvement, les spécimens cutanés sont suspendus dans un bain par des fils de soie fixés sur leur périmètre au moyen d'agrafes (jusqu'à 36 agrafes sur un

périmètre carré de 14 cm); ces fils assurent une transmission homogène des charges du spécimen aux distributeurs de forces (0-60 g et 0-12 mm). Les déformations et les rotations du spécimen sont mesurées dans la zone centrale du spécimen (environ 10% de la surface totale) à l'aide d'un système électro-optique, le *Video-Dimension Analyzer* (*VDA*), décrit par Yin *et al.* (1972). Le système *VDA* comme tout autre système d'imagerie incorporé à cette méthode requiert des repères (traces d'encre, particules, etc.) préalablement disposés à la surface du spécimen ainsi qu'une vitesse rapide d'aquisition des données.

Dans la même gamme, les tests de tractions multiaxiales proposés par Ragnell (1954) ont contribué jusqu'ici très faiblement à la compréhension du comportement mécanique de la peau.

2.2.3 Autres méthodologies

Parmi d'autres méthodologies, on retrouve les tests de: ballistométrie, cisaillement compression, friction, mécanique ondulatoire et traction normale (voir tableau 2.13). Plusieurs chercheurs œuvrant en réhabilitation se sont intéressés aux techniques de compression *in vivo* puisque la pression est un facteur clé de l'ischémie responsable en grande partie de l'escarrification. *In vivo*, la réponse aux *stimuli* de compression implique plusieurs tissus et pour ce qui est de la peau, elle est définie selon plusieurs mécanismes: la résistance des fibres de collagène, la pression hydrostatique du fluide extracellulaire, la viscosité entre les phases liquide et solide, et la pression osmotique du tissu (Lanir, 1987; Lanir *et al.*, 1990). Selon Lanir *et al.* (1993), la contribution des fibres de collagène à un *stimuli* de compression demeure nettement plus faible que tout autre essai de traction.

À l'état *in vivo*, il existe aussi d'autres tests dont les limitations sont tout aussi évidentes. Par exemple, prenons le cas de la réponse aux stimuli de traction normale ou «*levarometry*». Dans ce cas, la force normale est créée au moyen du retrait d'une surface plate collée à la surface de la peau. La réponse à ce type de stimulus peut être corrélée à l'élasticité du tissu cutané si les déformations sont petites et préférablement si le test est pratiqué aux sites des avant-bras puisque l'interface os-peau apparaît jouer un rôle plus que déterminant sur la réponse (Lanir *et al.*, 1993). Dans un tout autre but, ce test de

levarometry a déjà été utilisé afin de mesurer l'adhérence de greffes cutanées (Tavis *et al.*, 1976).

Enfin, la propagation ondulatoire permet d'étudier des *stimuli* modulés et donc, de caractériser la peau selon des champs d'énergie et de fréquences variées. Les *stimuli* sont des oscillations harmoniques longitudinales de faible amplitude et sont appliqués à l'aide de système électro-mécanique (e.g. «*speaker*») et pointe phonographique (Pereira *et al.*, 1991a; 1991b) ou de vibrateurs commerciaux (*e.g.* Bruel & Kjaer, 4810; Toyo-Baldwin, Rheovibron DDVII). Dans d'autres cas, les *stimulis* sont des impulsions de forte amplitude et on identifie ce test comme «ballistométrique» (Tosti *et al.*, 1977).

Tableau 2.13: Tests d'évaluation biomécanique de la peau moins répandus.

Tests	*In*	Auteurs
Cisaillement	*vitro*	Barocas *et al.* (1995); Hsu (1992); Hsu *et al.* (1994).
Compression	*vivo*	Barbenel et Payne (1981)‡; Dickstein et Hartzshtark (1981)†‡; Guibara *et al.* (1979)†; Hvidberg (1960)†; Lanir *et al.* (1990); Lanir *et al.* (1993); Lewis *et al.* (1965)†; Schade (1912)‡; Tregear et Dirnhuber (1965).
	vitro	North et Gibson (1978); Sakata *et al.* (1972).
Friction	*vivo*	Comaish et Bottoms (1971); Highley *et al.* (1977); Naylor (1955); Sanders *et al.* (1993).
Peeling test	*vivo*	Tavis *et al.* (1976)
Propagation ondulatoire	*vivo*	Dorogï *et al.* (1986)‡; Mridha *et al.* (1992).
	vitro	Dorogï *et al.* (1986)‡; Kronick et Sacks (1994); Pereira *et al.* (1991a); Pereira *et al.* (1991b); Tosti *et al.* (1977).
Traction normale	*vivo*	Dickstein et Hartzshtark (1981)‡; Dong *et al.* (1993); Lanir *et al.* (1993); Piérard (1980)‡.

† Cités dans Lanir (1987); ‡ Cités dans Marks (1991).

Par ailleurs, d'autres chercheurs (Barocas *et al.*, 1995; Hsu, 1992; Hsu *et al.*, 1994) ont étudié le comportement biomécanique dynamique de gels de collagène (structure du

«derme équivalent») au moyen de rhéomètres («*rheometric fluids spectrometer*»). Cet instrument permet l'application de *stimuli* en cisaillement (oscillations harmoniques et fluages): un embout conique est appuyé normalement à la surface du gel et la rotation contrôlée de l'embout cause le cisaillement du gel. Jusqu'ici, l'ensemble de ces tests a été mené sur des gels de collagène acellulaire.

2.2.4 Les limites des techniques de mesure

La connaissance des propriétés physiques de la peau et de ses constituants n'est pas avancée si on la compare à celle des propriétés biochimiques. En partie, cet état se traduit par un retard au développement de la bio-ingénierie et de la biophysique, et des difficultés intrinsèques à l'obtention de données physiques significatives et reproductibles de la peau.

La variabilité des propriétés physiques cutanées due aux sites anatomiques, à l'âge et au sexe, surpasse celle des propriétés biochimiques comparables (Marks, 1991). Comme le rapporte Lanir (1987), l'historique du tissu est un facteur clé de cette variabilité des propriétés mécaniques. On peut définir l'historique de la peau selon des caractéristiques interindividuelles (l'espèce, l'âge, le sexe, l'exposition au soleil, l'hydratation, le poids, les maladies, les différences biologiques entre les individus) et individuelles (le site anatomique, l'épaisseur, l'orientation, l'exposition au soleil, la grossesse, la consommation de drogues ou médicaments). Selon Yahia (1984), d'autres caractéristiques comme le degré d'activité physique ou d'immobilisation et le temps post-*mortem* définissent aussi l'historique des tissus.

Les conditions de conservation de la peau (la température, le milieu de conservation et la vitesse de congélation et de décongélation) constitue une autre source de variabilité des propriétés physiques (Karlsson et Toner, 1995; Quirinia et Viidik, 1991). Par exemple, la cristallisation de l'eau forme des micro-lacérations sur le réseau collagénique et déchiquète les structures cellulaires libérant ainsi des enzymes qui possèdent le potentiel de dénaturer les unités structurales. Pendant la congélation, des compartiments de solution hypertonique sont également formés et tout comme les enzymes, cette solution hypertonique peut causer la destruction des unités collagéniques. Les idées sont d'ailleurs partagées en ce qui concerne les résultats futurs de la décongélation de Walt Disney et les

plus mauvais pronostics décrivent un corps apparament similaire à un sandwich qui aurait passé quelques hivers sur une table à pique-niques.

In vivo, la peau jouit d'un environnement unique par sa température (~37°C), son pH (~7.4), sa pression sanguine, son plasma sanguin, son drainage lymphatique, ses activités métaboliques, ses contrôles nerveux et hormonal, et son état de tractions multiaxiales (Lanir, 1987). Ces conditions environnementales constituent des facteurs critiques de la variabilité des mesures des propriétés mécaniques *in vitro*. Le signe le plus visible de l'effet de ces conditions environnementales est la contraction d'un spécimen cutané suivant son excision (Lanir et Fung, 1974b). L'humidité est une autre condition environnementale qui affecte particulièrement les propriétés mécaniques du *stratum corneum in vitro* comme *in vivo* (voir §2.1.5).

In vitro, la variabilité des propriétés physiques se trouve également affectée par la procédure de préparation des spécimens. Les manipulations de l'excision faute d'outils adéquats conduisent souvent à des chargements excessifs de la peau. Comme il est difficile *in vivo* d'isoler la réponse du *stratum corneum* de celle du derme, plusieurs manipulations additionnelles et parfois très invasives sont accomplies afin d'isoler l'épiderme du derme (Lanir, 1987). Récemment, Germain *et al.* (1993) ont grandement amélioré cette étape par une technique très efficace d'isolation à la thermolysine (digestion très sélective de la jonction dermo-épidermique). De plus, d'autres manipulations entourant l'installation du spécimen entraînent à leur tour l'application de forces excessives sur la peau et d'ailleurs, peu d'investigateurs ont tenu compte de la minimisation de ces manipulations (Koutroupi *et al.*, 1990; Mansour *et al.*, 1993).

Au niveau méthodologique *in vivo* comme *in vitro*, tous les systèmes d'attaches présentent certaines limitations et sont susceptibles d'accroître la variabilité des mesures. D'une part, les pinces ou agrafes induisent des forces concentrées ou des champs de déformations inhomogènes (Lanir, 1987). D'autre part, l'utilisation d'adhésifs (*e.g.* la colle cyanoacrylate) altère généralement localement la structure de la peau. Dans les deux cas où on tient à limiter les forces nécessaires à l'utilisation de pinces ou la quantité d'adhésif, les problèmes de glissement peuvent survenir et affecter grandement les résultats des mesures. En contrepartie, ces désavantages peuvent être contournés par une

mesure directe suffisament éloignée des sites d'attache; cette procédure est généralement le propre des tests de traction biaxiale (tableau 2.12).

Quoiqu'il n'existe pas de méthode d'évaluation «idéale», plusieurs aspects des méthodes décrites précédemment peuvent être questionnées lorsqu'il s'agit de les comparer. Ainsi, les conditions spatiotemporelles influencent de façon majeure la variabilité des mesures: *i.e.* une mesure unidimensionelle diffère d'une mesure bidimensionnelle, une mesure prise à très court terme suivant un *stimulus* diffère d'une mesure à long terme. Certaines mesures découlent de champs de déformations homogènes (*e.g.* les tests de traction biaxiale *in vitro*) et leur interprétation est manifestement plus juste que celles découlant de champs de déformations inhomogènes (*e.g.* torsion, succion, compression, traction uniaxiale *in vivo*) (Lanir, 1987; Wijn, 1980).

Il existe aussi d'autres conditions de nature purement matérielle (assemblage et qualité des instruments) ou humaine dépendantes sûrement de l'avancement technologique ou de facteurs socio-économiques, qui contribuent à la variabilité des propriétés physiques.

Un autre problème rattaché aux propriétés physiques de la peau est le manque flagrant de standardisation des mesures (Marks, 1991). Il existe aujourd'hui une variété de technologies très avancées dont certaines sont commercialisées (e.g. *Cutometer* SM 474®, *Dermaflex*®, *Twistometer*®, etc.) (Serup, 1996). Les chercheurs et cliniciens comparent donc leurs mesures selon des méthodologies différentes et c'est ainsi que la confusion émerge. Ne l'oublions pas, trop souvent les chercheurs et cliniciens sont à la recherche de la même information. En ce sens, un comité de la société internationale *Bioengineering and the Skin* s'est donné le mandat depuis 1978 de développer des standards.

D'autre part, l'usage du terme «propriété» pour la peau implique qu'il y a eu une évaluation et au même sens que tout autres matériaux physiques. De cette pratique, il peut résulter que très peu de données dotées d'une pertinence clinique et/ou biologique. Cette pratique est plutôt applicable aux évaluations de tissus *in vitro*. Dans un tout autre contexte, les producteurs et manufacturiers de cuirs, textiles et laines sont aussi concernés par cette pratique. D'autre part, les cliniciens et/ou les biologistes sont plutôt concernés par des «fonctions» plutôt que par des propriétés.

Il est d'ailleurs aussi vrai que ces fonctions dépendent de propriétés, mais les différences conceptuelles et pratiques sont importantes. Idéalement, les évaluations sont produites *in vivo* dans des conditions environnementales très précises. Les évaluations *in vitro* ont elles aussi leur importance clinique puisque certaines données ne peuvent être obtenues que dans ces conditions. Dans ce cas, ces données requièrent de la prudence dans leur interprétation.

Que ce soit dans des conditions *in vivo* ou *in vitro*, il existe une variété de méthodes d'évaluation qui nous renseignent sur les fonctions mécaniques de la peau. Les données découlant de ces évaluations donnent des informations sur la valeur du diagnostic et permettent de mesurer la réponse au traitement. Si la sensibilité de la méthode le permet, ces données nous informent sur les altérations ou le progrès de la structure anatomique, la composition biochimique ou l'état physiologique.

2.3 La mécanique de la peau soumise à des états de tension

2.3.1 Représentations théoriques des mesures des propriétés mécaniques de la peau

En pratique, il est très difficile de déterminer très précisément la contribution de tous les liens moléculaires à partir d'observations macroscopiques de matériaux (> 10^{-6} cm) (Fung, 1969). Dans ce cas, les biomécaniciens appliquent la notion de *continuum* aux tissus vivants. Le concept du *continuum* matériel— une «idéalisation mathématique» du monde réel— est applicable aux problèmes où la structure fine de la matière peut être ignorée. Dans cette démarche, ceci ne signifie pas que la microstructure (sous les 10^{-6} cm) n'affecte pas les propriétés mécaniques des tissus mous.

A priori, il convient de préciser quelques expressions de la mécanique des *continua*, les contraintes et les déformations, utiles à la compréhension des notions appliquées à la biomécanique et à la normalisation des mesures (pour revue: Fung, 1969; 1993).

Les contraintes

Une charge est la force totale (en Newton[12]) appliquée à un solide alors qu'une contrainte normale (en Pascal) est la force appliquée à une surface du solide mesurée à angle droit à la direction de la force. La contrainte normale est soit de nature tensive ou compressive. Selon que la contrainte normale soit calculée selon l'aire initiale ou l'aire réelle, elle est respectivement nominale (conventionnelle ou dans le sens de Lagrange et Piola) ou rationnelle (réelle ou dans le sens de Cauchy et Euler). Les notations usuelles **T** et σ sont respectivement utilisées afin de désigner le tenseur[13] de contrainte de Lagrange et de Cauchy— le tenseur de contrainte est une grandeur représentant l'état de contrainte d'un volume. Toutefois, même dans des conditions idéales, il n'existe pas de méthodes accessibles, justes et efficaces qui permettent de déterminer la section droite réelle de la peau sur laquelle s'applique la charge. Pour cette raison, l'usage de **T** est généralement commun à la biomécanique (Fung, 1967; 1993). Un autre type de tenseur couramment employé en biomécanique est le tenseur de Kirchhoff (**S**) (Fung, 1993). Quelle que soit le type de contrainte sélectionné, ce qui est important de retenir c'est leur convertibilité d'un à l'autre.

Prenons comme exemple le cas d'une section initiale d'un solide de hauteur (h_0) et de largeur (L_0). Soumise à une force tensive normale (F_{11}), il en résulte une section réelle de hauteur (h) et de largeur (L). La contrainte normale est définie de la façon suivante:

- selon Cauchy et Euler: $\sigma_{11} = \dfrac{F_{11}}{Lh}$;
- selon Lagrange et Piola: $T_{11} = \dfrac{F_{11}}{L_0 h_0}$;
- selon Kirchhoff: $S_{11} = \dfrac{1}{\lambda_1} T_{11}$.

D'autre part, la contrainte de cisaillement— une force appliquée à une surface d'un solide mesurée parallèlement à la direction de la force; prenez l'exemple du jeu de cartes— est généralement négligeable dans le cas du tissu cutané en raison des conditions membranaires (*i.e.* de grandes déformations (voir § suivant) et une faible épaisseur du spécimen) (Adkins et Rivlin, 1952, Thibault et Fry, 1983; Brodland, 1988; Haddow et

---

12 On utilise aussi le gramme (g) équivalant à $9.81 \cdot 10^{-3}$ N et le dyne (dyn) valant 10^{-5} N.

13 Un tenseur est une grandeur mathématique a plusieurs composantes ayant des propriétés d'invariance formelle par changement de base (Larousse, 1992).

al., 1992; Williams *et al.*, 1992). Dans ces conditions, la charge est principalement supportée par des contraintes normales dites membranaires, car la résistance en flexion définie par les contraintes de cisaillement, est négligeable.

Les déformations

Aux contraintes sont associées les déformations— *Ut tensio sic vis*, principe de Hooke: (1678). Les déformations sont adimensionnelles (généralement en pourcentage) et définies à partir d'un changement de la distance qui sépare deux points arbitraires connus d'un solide (voir §10.2: Fung, 1993). Prenons la distance originale exprimée par ds_0 et celle dans la configuration déformée par ds. Les déformations finies que subit ce solide peuvent être représentées sous forme de tenseurs Lagrangien ou Eulerien qui sont respectivement le tenseur de Green (Green et Saint-Venant) ($\mathbf{E}$) et le tenseur d'Almansi (Almansi et Hamel) ($\mathbf{e}$):

$$ds_0^2 - ds^2 = 2E_{ij}da_i da_j$$

$$ds_0^2 - ds^2 = 2e_{ij}dx_i dx_j$$

où la variable (a_1, a_2, a_3) réfère à toutes particules du volume original du solide et (x_1, x_2, x_3) réfère aux coordonnées de la particule lorsque le solide est déformé; les indices (i, j) sont sous la notation de Einstein: la convention de sommation pour des indices répétées.

Dans le cas de déformations infinitésimales inférieures à 0.2% — celles-ci décrivent le champ d'application de la mécanique classique (Fung, 1969)— il n'existe pas de différence entre les représentations Lagrangienne et Eulerienne. En conséquence, les déformations sont exprimées selon le tenseur de Cauchy (ε) (voir fin du prochain §) qui constitue une simplification commune aux tenseurs Lagrangien et Eulérien.

Dans le cas de déformations finies— celles-ci représentent le champ d'application de la peau et d'un nombre de plus en plus grandissant de polymères— il n'est pas toujours possible de donner une interprétation géométrique simple des composantes des tenseurs de Green et d'Almansi comme le cas des déformations infinitésimales. Prenons comme exemple le cas de deux allongements uniaxiaux ($\Delta\ell$) d'une longueur initiale (ℓ_0) équivalent à l'unité, le premier est infinitésimal (*e.g.* 0.01) et le second est fini (*e.g.* 1).

Les déformations définies par les tenseurs de Green et Almansi seront les suivantes (*i.e.* infinitésimale et (finie)):

- selon Green: $E_{11} = \frac{1}{2}\left(\frac{\ell^2 - \ell_0^2}{\ell_0^2}\right) = .01\ (1.5)$;
- selon Almansi: $e_{11} = \frac{1}{2}\left(\frac{\ell^2 - \ell_0^2}{\ell^2}\right) = .01\ (.375)$;
- selon Cauchy: $\varepsilon = \frac{\Delta\ell}{\ell_0} = .01\ (1)$.

Selon cet exemple, il est clair que l'utilisation du tenseur de Cauchy est inappropriée aux cas de déformations fines et que l'interprétation géométrique des tenseur de Green et d'Almansi est plus complexe (Fung, 1967).

Par ailleurs, le rapport d'extension (λ) qui équivaut au rapport ℓ/ℓ_0 est couramment utilisé afin d'alléger la formulation de ces tenseurs de déformations.

2.3.2 Les relations contraintes *versus* déformations

Les courbes de contraintes *versus* déformations («*stress-strain*») des tissus mous lorsqu'ils sont soumis à un état de traction uni-, bi- et multiaxiale, sont non-linéaires quelque soit l'orientation étudiée (Fung, 1967; Lanir et Fung, 1974b). Dans le cas de la peau, cette relation non-linéaire de forme exponentielle ou sigmoïdale (Daly, 1982; Gibson *et al.*, 1965; Kenedi *et al.*, 1975; Lanir et Fung, 1974b; Millingtion et Wilkinson, 1983) (voir figure 2.12) est «mathématiquement» complexe à décrire (Fung, 1967; voir §7.5.1 dans Fung, 1993). Néanmoins, les quatre parties de cette relation rassemblent un bon nombre d'informations sur la microstructure de la peau, son élasticité et sa résistance mécanique (voir §2.1.2.7 et figure 2.12).

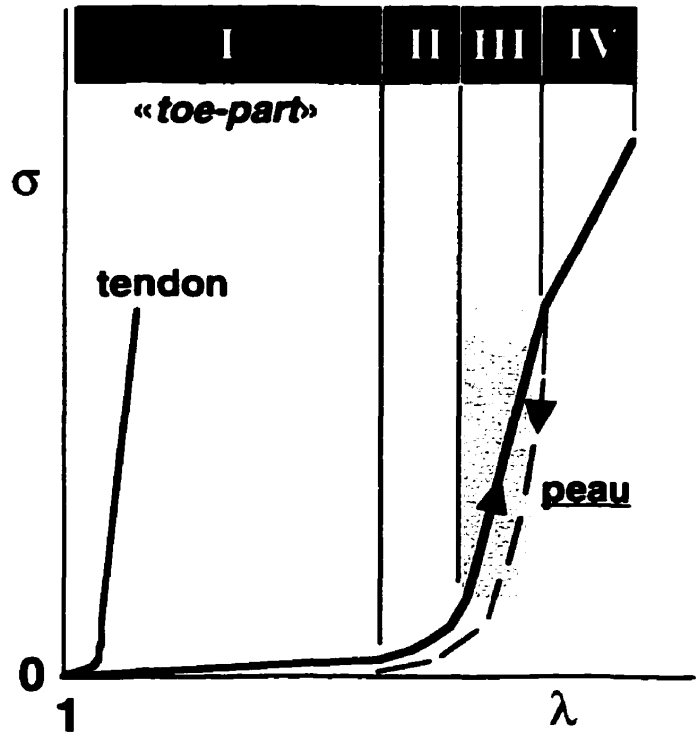


Figure 2.12: Courbe typique normalisée de contraintes *versus* déformations de la peau. (I) Réarrangement des fibrilles de collagène, interactions entre les composantes et sollicitation des fibres élastiques («*toe-part*»); (II) Transiton; (III) Taux linéaire d'élasticité des fibrilles de collagènes; (IV) Zone de rupture des fibrilles de collagène. Charge (—) et décharge (— — —). Notes : La proportion de la *toe-part* est réduite le long des lignes de tension de Langer.

La zone réversible de la relation contrainte *versus* déformation s'étend sur les trois premières parties de la courbe (figure 2.12). Les taux d'élasticité— l'expression «module d'élasticité» est aussi fréquemment employée mais ne doit être associé en aucun temps à celui d'Young très spécifique aux matériaux conventionnels (aciers, alliages, Al, etc.)— de la portion (I) et (III) de la courbe témoignent respectivement de la rigidité des fibres élastiques et du réseau collagénique du derme. Par ailleurs, la surface sous la courbe de la relation contraintes *versus* déformations équivaut à une énergie et caractérise tant l'état réversible (énergie de déformation) que l'état de rupture mécanique de la peau (énergie de rupture ou ténacité).

Quoique très communes, les courbes contraintes-déformations cutanées ne nous informent pas directement sur les propriétés élastiques puisque la peau est dotée de propriétés amortissantes telles qu'expliquées au §2.1. Dans certaines conditions (e.g. *quasi*-statique, préconditionnement), les taux calculés de cette courbe peuvent être associés à l'élasticité de la peau.

2.3.3 L'hystérésis

Lors d'un cycle de charge/décharge de la peau dans la zone réversible (*e.g.* voir partie I, II et III de la figure 2.12), la courbe *stress-strain* de la décharge subit un léger affaissement (Lanir et Fung, 1974b). L'aire qui caractérise cette différence entre les deux courbes est la surface d'hystérésis et celle-ci représente une énergie dissipée pendant le cycle de charge/décharge. En conséquence, cette perte d'énergie témoigne du caractère viscoélastique de la peau (Fung, 1993). L'énergie dissipée peut être associée au mouvement du fluide ou aux propriétés intrinsèques des chaînes moléculaires cutanées *in situ* comme nous l'avons vu au §2.1.

2.3.4 Le taux de déformation

Les tissus mous sont en partie similaires aux tissus osseux puisqu'ils sont insensibles aux taux de déformation selon des conditions physiologiques (Fung, 1967; Fung, 1972; Lanir et Fung, 1974b). Par exemple, ceci se traduit par un très faible décalage de la courbe contraintes *versus* déformations et une surface d'hystérésis pratiquement constante. Cette insensibilité en rapport avec le taux de déformation est perçue à l'intérieur d'un champ équivalent à 10^3 (Fung, 1993).

2.3.5 Relaxation et fluage

Les comportements de relaxation et de fluage servent à établir les propriétés viscoélastiques de plusieurs polymères et tissus mous (Fung, 1993; McCrum *et al.*, 1990). Les comportements cutanés de relaxation et de fluage ont été observés par plusieurs investigateurs suivant une variété de méthodes telles que la succion, la torsion, la traction uni- et bi-axiale (tableaux 2.8 à 2.13).

La relaxation de la peau est généralement observée en appliquant une «déformation-échelon». En maintenant cette déformation pour une certaine durée (contrôle de déplacement, figure 2.13a). Pendant cet état de déformation, la contrainte est étudiée en fonction du temps (*t*) (Lanir, 1976; Lanir et Fung, 1974b). La relaxation de contrainte est alors interprétée à l'aide d'une caractéristique normalisée, la fonction de relaxation réduite («*reduced relaxation function*») exprimée par:

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\sigma(t=0)}$$

Cette fonction $G(t)$ peut être décrite par une sommation de termes exponentiels (Fung, 1972) ou par une expression polynômiale (Lanir, 1976). La peau ne possède pas une unique fonction $G(t)$ puisque celle-ci est dépendante de la contrainte initiale ou de la déformation (Lanir, 1976; 1979; Lanir et Fung, 1974b). Cette observation est importante puisqu'elle révèle un comportement viscoélastique non-linéaire. Ce n'est que dans le cas de petits incréments de déformation autour d'un niveau de déformation que l'hypothèse de viscoélasticité linéaire— $G(t)$ unique— est valide et d'ailleurs, cette hypothèse soutenue par Fung (1970) porte le nom de viscoélasticité quasi-linéaire.

De façon inverse, le fluage de la peau est observé en appliquant une «contrainte-échelon» et en maintenant cette charge pour une certaine durée (contrôle de charge, voir figure 2.13b). Pendant cet état de charge, la déformation peut être décrite par une fonction exponentielle du temps (Millington et Wilkinson, 1983). Les caractéristiques les plus usuelles (voir tests de succion et de torsion dynamiques aux tableaux 2.9 et 2.10) sont présentées à la figure 2.13b. Selon les expériences menées par Fung (1993), le fluage à la fois dépendant du temps et du niveau de déformation est fondamentalement plus non-linéaire que la relaxation en contrainte. C'est pourquoi le fluage ne peut obéir à l'application de l'hypothèse de viscoélasticité quasi-linéaire. Pourtant pour des gels de collagène, Barocas *et al.* (1995) ont rapporté un comportement viscoélastique très linéaire selon un champ de contraintes de 1-7 dyne·cm^{-2}. Peu de détails sont cependant donnés par Barocas *et al.* (1995) concernant l'impact de leur niveau de charge sur la structure.

La peau soumise à un test de fluage a tendance à se comporter comme un fluide viscoélastique qui est une caractéristique très spécifique des gels (voir les déformations et recouvrance retardées de la figure 2.13b) (Flügge, 1975; Hsu, 1992). L'étude

rhéologique (en fluage) menée par Barocas *et al.* (1995) sur des gels de collagène a également révélé un comportement de la sorte.

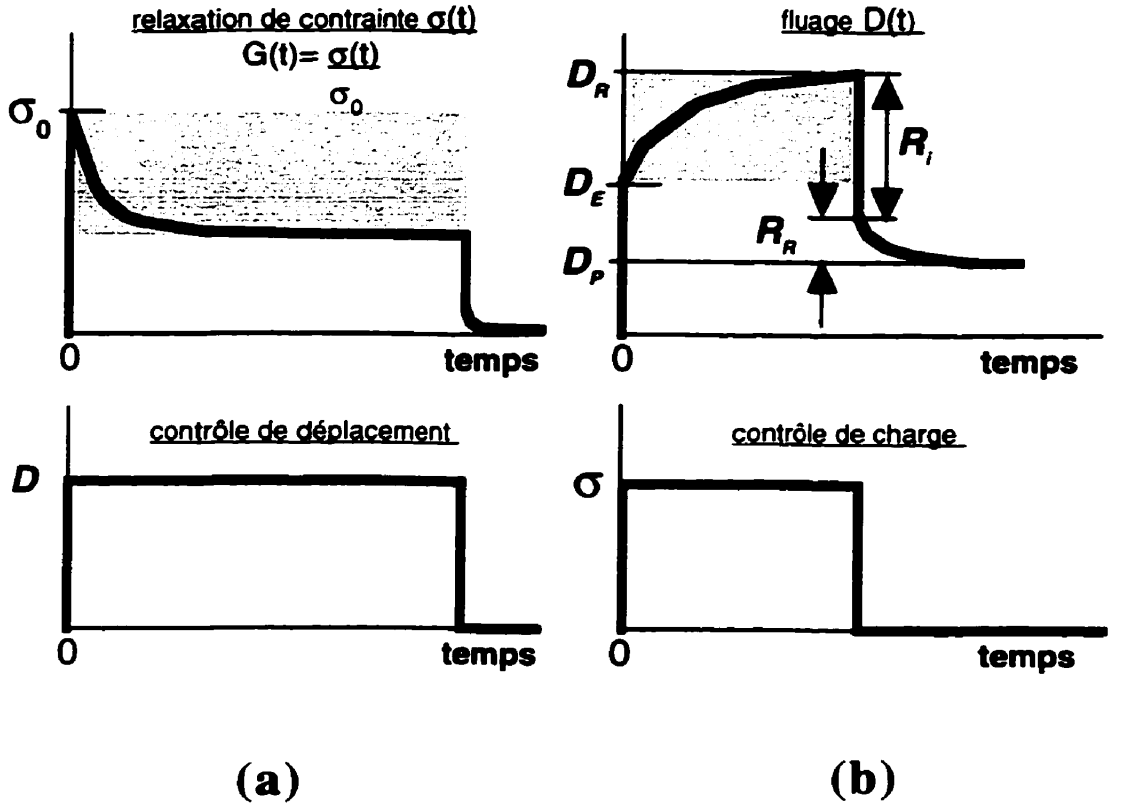


Figure 2.13: Courbes typiques normalisées de relaxation de contrainte et de fluage de la peau. (a) Relaxation de contrainte: la peau subissant une «déformation-rampe» est caractérisée par une fonction de relaxation réduite (*G(t)*). Note: La relaxation de contrainte (zone grise) est accentuée suivant de plus grandes amplitudes de déformation. (b) Fluage: La peau subissant une «contrainte-échelon» est caractérisée par une déformation élastique instantanée (D_E), une déformation retardée (D_R), une recouvrance instantanée (R_I), une recouvrance retardée (R_R) et parfois un déformation permanente (D_P). Note: La portion de courbe D_E-D_R (zone grise) correspond au phénomène de fluage.

2.3.6 La réponse cutanée aux *stimuli* dynamiques: oscillations sinusoïdales

La réponse cutanée à des *stimuli* sinusoïdes dynamiques (ou fonction harmonique de temps) sert à définir les propriétés viscoélastiques de plusieurs polymères et tissus mous (Fung, 1972; McCrum *et al.*, 1990). Dans le cas de la peau, les *stimuli* sont généralement

des harmoniques angulaires ou uniaxiales superposées à un niveau de charge ou déformation (Barbenel et Evans, 1977; Barocas *et al.*, 1995; Finlay, 1970; Hsu, 1994; Mansour *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 1991b; Rasseneur *et al.*, 1982). Les *stimuli* ont la forme décrite par la figure 2.14 et s'expriment par la relation suivante:

$$\varepsilon(t)= \varepsilon_0 \sin(\omega t)$$

où ω est la fréquence angulaire et ε_0 l'amplitude de déformation du *stimuli*. Les petites déformations, ε_0, sont une condition *sine qua non* pour obtenir une réponse en contrainte harmonique et par conséquent, une relation linéaire entre le *stimulus* et la réponse (Finlay, 1970; Fung, 1972). Expérimentalement, ceci se traduit au niveau angulaire par une oscillation en torsion de ±2° (Finlay, 1970) et au niveau d'une traction par une amplitude ε_0 de 4% (Fung, 1969).

La réponse en contrainte harmonique a la forme présentée à la figure 2.14 et est décrite par la relation suivante:

$$\sigma(t)= \sigma_0 \sin(\omega t+\delta)$$

où δ est la phase ($0 \leq \delta \leq \pi/2$) et σ_0 l'amplitude de la réponse. Le ratio $\delta \cdot \omega^{-1}$ représente le décalage temporel entre le *stimulus* et la réponse. Suivant des manipulations algébriques assez simples, les chercheurs utilisent une équivalence de $\sigma(t)$ possédant une partie complètement en phase avec le *stimulus* et une autre entièrement déphasée:

$$\sigma(t)= \varepsilon_0 E' \sin(\omega t) + \varepsilon_0 E'' \cos(\omega t)$$

où E' est appelé le module de conservation[14] «élastique» (la partie en phase) et E'', le module de perte «visqueux» (la partie déphasée),

$$E' = \sigma_0 \cos \delta / \varepsilon_0$$

$$E'' = \sigma_0 \sin \delta / \varepsilon_0$$

Quoique ces caractéristiques cutanées, similairement à la relaxation et au fluage, soient dépendantes du niveau de contrainte appliquée— celle-ci est appliquée avant la superposition de la sinusoïde, ne l'oublions pas— E' et E'' varient peu dans un spectre de fréquence 200 à 10^3 Hz (Pereira *et al.*, 1991b). Cette insensibilité est comparable à celle révélée par Fung (1972) chez d'autres tissus mous pour des spectres de ω variant de 10^2-10^3 Hz et à celle rapportée par Hsu (1994) pour des gels de collagènes soumis à des ω variant de 10^{-1} à 10^2 Hz dans des conditions environnementales spécifiques (forces ioniques, viscosité du milieu, GAGs, température). Par ailleurs, Wilkes et Wildnauer

---

14 L'expression «module de stockage» est aussi utilisée.

(1973) ont remarqué cette même insensibilité chez le *stratum corneum* pour des spectres de ω variant de 4 à 110 Hz.

Par ailleurs, les caractéristiques de E' et E'' peuvent être converties en deux autres fréquemment utilisées dans la description du comportement viscoélastique des tissus mous, soit l'amortissement interne ($\tan \delta$) et le module de rigidité dynamique (E^*) (Fung, 1972):

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'}; \qquad E^* = \sqrt{(E')^2 + (E'')^2}$$

L'amortissement interne, tout comme l'hystérésis, correspond à une énergie dissipée. De façon comparable, tout comme l'hystérésis est insensible au taux de déformation, l'amortissement interne de la peau est constante dans une certaine gamme de ω. Chez d'autres tissus mous, l'amortissement interne demeure insensible à une gamme de ω équivalente à 10^{-2} à 10^2 Hz (voir §7.6.5 de Fung, 1972). Dans le cas où $\delta = 0$, on dira que la peau se comporte de façon purement élastique alors que dans le cas où $\delta = \pi/2$, la peau possède un comportement strictement visqueux. Pereira *et al.* (1991b) ont démontré que l'amortissement interne de la peau était stable (δ = .54) pour une gamme de ω équivalente à 0 à 10^3 Hz et indiquait un comportement clairement viscoélastique plus près de purement élastique que visqueux. Par ailleurs, Wilkes et Wildnauer (1973) ont rapporté cette même stabilité chez le *stratum corneum* humain mais pour des gammes de ω équivalente à 4 à 110 Hz; ceux-ci ont aussi démontré l'accroissement «exponentiel» de δ (de .05 à 25) en fonction de la température (-30 à 40°C).

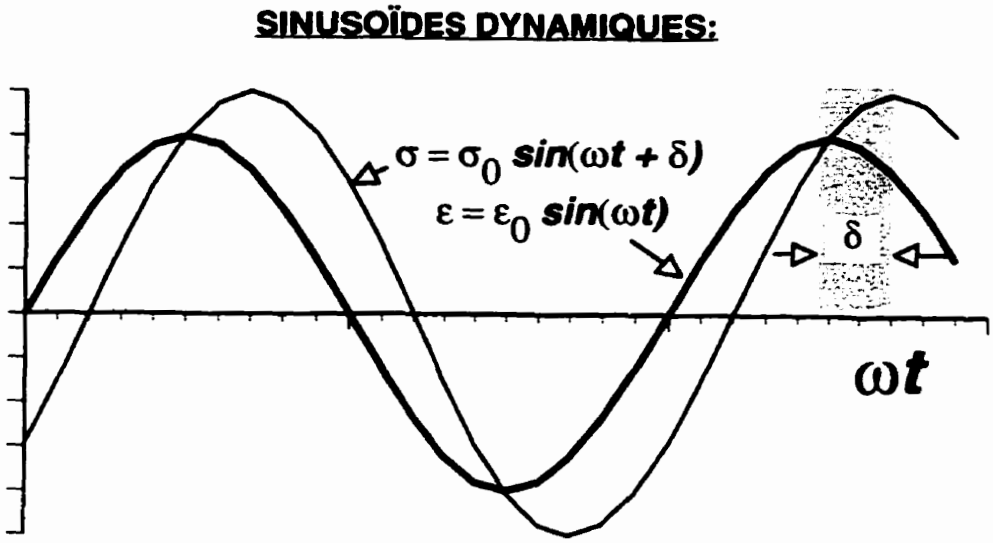


Figure 2.14: Courbes typiques des oscillations harmoniques servant à caractériser un comportement viscoélastique quasi-linéaire.

2.3.7 Le préconditionnement

Le concept de «préconditionnement» réfère à une réduction de la contrainte entre le premier, le second et les autres cycles de charge-décharge d'un test de traction uniaxiale des tissus mous (Fung, 1967; 1972). Après un certain nombre de cycles, la réduction de la contrainte s'estompe et éventuellement le test devient reproductible: la peau devient alors préconditionnée. Suivant un contrôle de charge, il est aussi possible de préconditionner la peau (Mansour *et al.*, 1993). Dans les cas de traction biaxale (Lanir et Fung, 1974b) et de torsion (Finlay, 1970), l'état de préconditionnement de la peau est différent et nécessite une procédure propre à chaque test. Quoiqu'il n'existe pas de théorie détaillant ce concept, il est important de connaître le nombre de cycles conduisant à

cet état. Selon Lanir (1987), le temps de recouvrement de l'état précédant le préconditionnement se calcule en heures.

Le préconditionnement est aussi vu comme une simplification de l'interprétation du comportement viscoélastique des tissus mous puisqu'à partir de cet état, on considère ces tissus comme «pseudo-élastiques» (Fung, 1993). L'usage de ce concept en biomécanique est grandement favorisé par l'insensibilité que démontre l'hystérésis des tissus mous aux taux de déformation. De cette façon, il est possible d'approximer le comportement viscoélastique (*i.e.* l'hystérésis) de la peau en appliquant des notions d'élasticité aux deux relations de charge et de décharge. *In vitro*, l'état de préconditionnement est généralement considéré comme le plus représentatif de l'homéostasie.

D'autre part, l'effet de Mullins— décrit par Johnson et Beatty (1995), le tissu est plus rigide lors du premier cycle de charge à un nouveau *maximum* de charge que pour les cycles subséquents: *e.g.* nous observons cette propriété lorsque nous gonflons un ballon et aussi, cet effet est spécifiquement observé chez le muscle ventriculaire passif— peu connu contribue également à favoriser l'usage du préconditionnement.

2.3.8 La plasticité

La rupture de la peau n'est pas un fait commun, elle survient généralement lors de *trauma* provoqués par des objets pénétrants (*e.g.* projectiles, tôle, etc). Dans ce contexte, la rupture est de nature tensive et indépendante de la géométrie des objets perforants de même que de la vitesse du chargement (Gadd *et al.*, 1967, cités dans Lanir, 1987).

Quoique la rupture totale de la peau ne soit pas commune, la peau peut subir une variété d'endommagements causés également par des contraintes tensives. Les vergetures constituent la plus grande porportion de ces endommagements et surviennent pendant une période de grossesse, du *body-building* excessif, gain de poids excessif, etc.

Au sens mécanique, la plasticité de la peau est une propriété grâce à laquelle celle-ci peut subir un certain endommagement du fait d'un chargement imposé. Cet endommagement peut provenir soit d'une plastification locale et répétée du matériau (fatigue), soit de la

présence d'une fissure. La connaissance de ce domaine est nécessaire à l'élaboration de méthodes d'évaluation du domaine élastique que ce soit *in vivo* ou *in vitro*.

À prime abord, si un solide dépasse la contrainte limite élastique du matériau constituant, celui-ci entre dans un domaine plastique. Chez les solides cristallins, la contrainte limite élastique est définie par des critères bien établis, tels que ceux de Tresca (cisaillement maximum) et Von Mises (énergie de distorsion maximum). En traction uniaxiale, une *limite d'élasticité conventionnelle* est déterminée en faisant usage d'une droite parallèle au module d'Young et passant par le point d'abscisse 0.2% (Dorlot *et al.*, 1986)

En contrepartie pour la peau, les notions abordées sont plutôt utilitaires: on cherche à prédire l'endommagement du spécimen (permanent ou jusqu'à la rupture) à partir d'un nombre de propriétés aussi restreint que possible et on s'en tient à des lois empiriques d'endommagement (Jørgensen *et al.*, 1993; Quirinia et Viidik, 1991).

En traction uniaxiale, le domaine plastique cutané est décrit suivant les caractéristiques mécaniques suivantes: la contrainte ultime (maximale), la contrainte et la déformation à la rupture— ce point de propagation brutale des fissures est généralement établi selon une chute de contrainte relativement à la contrainte ultime— et la ténacité. Cette dernière est caractérisée par la résistance à la rupture et elle est mesurée par l'énergie requise afin d'entraîner la rupture (voir §4.3: Dorlot *et al.*, 1986; Jørgensen *et al.*, 1993; Quirinia et Viidik, 1991):

$$W_{rupture} = \int_0^{\varepsilon_{rupture}} T \, d\varepsilon$$

Par ailleurs, la déformation permanente présentée par les coubes de fluage représente la seule caractéristique rapportée dans des conditions *in vivo* (voir D_P de la figure 2.13b)

Bien qu'il n'existe pas de *consensus* sur l'amplitude de ces caractéristiques mesurées dans des conditions *in vitro*, on sait néanmoins que la contrainte maximale est plus grande: selon les lignes de tension de Langer, pour le sexe mâle et en veillissant (Lanir, 1987). Plusieurs chercheurs (cités dans Lanir, 1987) ont aussi remarqué pendant de longs tests de fluage une baisse de la contrainte maximale (jusqu'à un cinquième de la valeur mesurée avant le fluage).

2.4 Modélisation des propriétés biomécaniques cutanées

Du point de vue pratique, si on désire optimiser les propriétés mécaniques d'équivalents cutanés, l'utilisation d'un modèle est absolument indispensable. Pour la peau, un modèle biomécanique «parfait» est avant tout simple et il intègre des phénomènes biomécaniques conformes à la fonction mécanique étudiée. Jusqu'ici, trop peu de phénomènes fondamentaux comme le remodelage intégrant les mécanismes cellulaires ont été intégrés aux équations constitutives.

L'équation constitutive qui résulte de la formalisation possède plusieurs avantages:

i— Elle facilite la compréhension des phénomènes biomécaniques;

ii— Elle contribue à la normalisation des résultats expérimentaux de plusieurs tissus biologiques;

iii— Elle facilite la corrélation des propriétés biomécaniques avec des paramètres physiques et physiologiques;

iv— Elle permet de formuler des expériences critiques afin de valider des expériences de base. L'équation constitutive ne peut remplacer une évaluation expérimentale déjà très précise mais peut rendre de très grands services en connaissant ses limites d'applicabilité.

Les trois principales formalisations proposées dans la mécanique cutanée sont les *continua* mécaniques, les modèles «phénoménologiques»[15] et les modèles «structurels» (Lanir, 1987).

2.4.1 Les modèles phénoménologiques

Les modèles phénoménologiques sont utilisés en viscoélasticité depuis plusieurs années dans le but de modéliser le comportement mécanique d'une multitude de matériaux (Flügge, 1975). Ces modèles également appliqués aux tissus mous peuvent être constitués de trois éléments mécaniques: le ressort, l'amortisseur et l'élément de friction (ou de St-Venant) (Butler *et al.*, 1978; Fung, 1972; Jamison *et al.*, 1968; Viidik, 1968) (figure 2.15). Le ressort représente une composante élastique généralement linéaire (*i.e.*

---

15 Modèle d'éléments discrets ou modèle rhéologique sont d'autres synonymes.

loi de Hooke des solides); l'amortisseur constitue une composante visqueuse dépendante du taux de déformation (*i.e.* loi de Newton des fluides) et enfin, l'élément de St-Venant est une composante modélisant une déformation permanente. Les modèles phénoménologiques sont des arrangements divers (en série et/ou en parallèle) de plusieurs de ces éléments (Barocas *et al.*, 1995; Fung, 1972; Jamison *et al.*, 1968; Gunner *et al.*, 1984; Wijn, 1980). Les équations résultant de ces modèles rhéologiques sont formulées à partir de contraintes, de déformations et de taux de déformations.

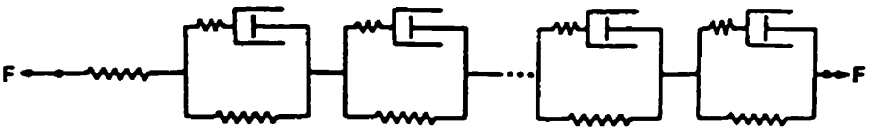


Figure 2.15: Modèle phénoménologique proposé par Fung (1972) pour les tissus mous. Ressort ( ); Amortisseur ( ). Notes: La tension de chaque ressort est une fonction non-linéaire de sa déformation; les ressorts possèdent le même type de non-linéarité mais sont de tailles différentes; les amortisseurs sont respectivement linéaires à la tension des ressorts.

Les modèles rhéologiques offrent l'avantage de visualiser rapidement les propriétés biomécaniques tissulaires. Cependant, ces modèles comportent plusieurs limitations:

a— Ils sont employés sur des tissus homogènes, isotropiques et sans historiques (Fung, 1972; Jamison *et al.*, 1968);

b— Ils ne permettent pas de comprendre les mécanismes biophysiques et de relier les propriétés biomécaniques à sa structure (Jamison *et al.*, 1968; Viidik, 1968; Yahia, 1984);

c— Ils ne corrèlent pas un comportement viscoélastique non-linéaire (Butler *et al.*, 1978);

d— Le calcul numérique des constantes caractérisant les éléments de ce modèle est souvent complexe.

Par ailleurs, si l'usage d'un plus grand nombre d'éléments permet une meilleure corrélation avec les résultats expérimentaux, en contrepartie, il n'offre pas de solution unique (Crisp, 1972).

Manifestement, le meilleur modèle de ce type est celui utilisé par Fung (1972) pour sa théorie de viscoélasticité quasi-linéaire (VQL); le modèle est présenté à la figure 2.15. Avec ce modèle, Fung a modélisé les phénomènes de relaxation en contrainte, d'oscillations harmoniques et d'insensibilité de l'amortissement interne de plusieurs tissus mous relativement à une certaine gamme de ω. L'usage très répandu de la VQL a démontré des résultats très satisfaisants pour plusieurs tissus mous, à l'exception de la peau pour laquelle aucune étude n'a été menée en ce sens (pour revue: Johnson *et al.*, 1996).

Plus récemment, Barocas *et al.* (1995) ont combiné au modèle phénoménologique de Maxwell décrivant le comportement mécanique des fluides à un nouvel élément de traction cellulaire caractéristique des tissus mous vivants. Cette théorie phénoménologique particulièrement adaptée aux besoins de l'ingénierie tissulaire (*i.e.* la compréhension des interactions cellules-matrices) est dérivée du *continuum* mécanique monophasique proposé par Oster *et al.* (1983). Dans ce modèle original, plusieurs aspects de la dymanique cellulaire (division, migration, convection) y sont intégrés. Sur ce point, l'approche développée par Tranquillo et ses collaborateurs (Barocas et Moon) constitue un repère très intéressant à considérer dans l'élaboration de modèles dermo-épidermiques, qu'ils soient phénoménologiques ou des *continua* mécaniques.

2.4.2 Modèles de *continua* mécaniques

Les modèles de *continuum* mécaniques permettent d'étudier les propriétés biomécaniques des tissus mous à une échelle macroscopique. Les relations empiriques émergeant de ces modèles n'ont pas de sens microstructurels et aussi, ne possèdent généralement pas de représentation phénoménologique. Quoique cette approche soit très populaire et savamment développée dans le cas de la peau, certains auteurs qualifient péjorativement cette approche de simple «*curve-fitting*».

Un grand nombre de ces modèles (en références. au tableau 2.14) fait intervenir dans leur formulation des termes exponentiels étant donné de la convexité des courbes *stress-strain* de la peau. De plus, une formulation peut inclure un grand nombre de constantes (jusqu'à quinze, Tong et Fung, 1976) dépendamment des objectifs poursuivis par ces modèles (élasticité *versus* viscoélasticité, une *versus* trois dimensions isotropie *versus* anisotropie, incompressibilité *versus* compressibilité) (Fung *et al.*, 1993; Tong et Fung, 1976). Un but commun à plusieurs de ces modèles est de décrire le comportement pseudo-élastique de la peau. La pseudo-élasticité nécessite que l'on modélise distinctement deux courbes contraintes vs déformations (charge et décharge) dues à l'hystérésis.

Tableau 2.14: Modèles de *continua* mécaniques développés pour la peau. Modèle de contrainte uniaxiale ($T(\lambda)$); Modèle d'énergie de déformation ($W(\lambda)$); Modèle viscoélastique linéaire ($\mathfrak{I}(t)$).

Modèle	Caractéristique	Auteurs
$T(\lambda)$	Isotropie Uniaxiale	Alexander et Cook (1977); Vlasblom (1967)† Elden (1970)†; Glaser *et al.* (1965)†; Kenedi *et al.* (1965)†; Ridge et Wright (1965)†
	Théorie des membranes	Danielson (1973)†‡; Danielson et Natarajan (1975)†‡
$W(\lambda)$	Isotropie	Allaire *et al.* (1977)†‡; Peng *et al.* (1978)†; Snyder et Lee (1975)†; Veronda et Westmann (1970);
	Orthotropie	Tong et Fung (1976);
$\mathfrak{I}(t)$	Relaxation	Barbenel *et al.* (1973)†; Kenedi *et al.* (1960)†; Lanir (1976);
	Fluage	Galford et McElhaney (1970)†; Sanders (1973)†; Vlasblom (1967)†;

† Cités dans Lanir (1987); ‡ Cités dans Larrabee (1986).

Une approche commune employée par les biomécaniciens dans la modélisation du comportement pseudo-élastique de la peau est l'usage d'une pseudo-fonction d'énergie de déformation (Fung, 1993).

Quelle est l'utilité d'une pseudo-fonction d'énergie de déformation? Le potentiel de W repose sur son applicabilité aux matériaux «hyper-élastiques» («*Green elastic*») comme la

peau, les élastomères, les vaisseaux sanguins, le mésentère, etc. W est exprimée à partir du tenseur de déformation finie: $W(\mathbf{E})$. De plus, W est mesurée relativement à un état naturel libre non-contraint (§7.11: Fung, 1993):

$$W(\lambda_i) = \sum_{i=1}^{3} \int_1^{\lambda_i} T_i \, d\lambda_i \qquad \left[\frac{N \bullet m}{m^3}\right]$$

Avec ces modèles, on constate généralement une excellente interpolation des données expérimentales. En contrepartie, l'instabilité des constantes d'une expérience à l'autre constitue un grand désavantage aux objectifs de généralisation (Crisp, 1972). Il est d'ailleurs assez rare que ce modèle puisse supporter une variété d'états de déformations pourtant nécessaires dans bien des cas à la détermination de toutes les constantes. Étant donné leur empirisme, il est aussi difficile de minimiser l'erreur quadratique d'un tel modèle avec les données expérimentales .

Plus récemment, Johnson *et al.* (1996) ont rapporté la *Single Integral Finite Strain* (SIFS) qui modélise les phénomènes viscoélastiques non-linéaires (courbe *stress-strain*; relaxation en contrainte; oscillation harmonique de déformations finies). Ce modèle utilise un concept de «perte de mémoire»: *i.e.* l'état de déformation le plus récent prédomine sur ceux antérieurs dans la détermination de la réponse en contrainte. La SIFS est une formulation très non-linéaire; elle se réduit à un modèle d'élasticité finie au temps zéro. De plus, elle supporte la viscoélasticité linéaire comme la VQL de Fung (1972) à la condition de pouvoir se linéariser. Jusqu'ici, la validation de ce modèle repose uniquement sur des tests *in vitro* de traction uniaxiale de ligaments et de tendons mais son application à d'autres tissus mous représenterait un potentiel intéressant.

2.4.3 Les modèles structurels

Les modèles structurels reposent sur des comportements connus des composantes de la peau. Les réponses mécaniques de ces composantes sont combinées ou généralisées afin de produire une description générale du comportement mécanique cutané. Les chercheurs réfèrent spécifiquement à ces modèles afin de clarifier la relation structure *versus* propriétés mécaniques puisque la formalisation de ces modèles est basée sur des paramètres dotés d'un sens physique bien défini. Manifestement, il est aussi juste de

penser que l'élaboration de tels modèles constitue un défi très ambitieux et conduit dans bien des cas à l'utilisation de structure «idéalisée» (Yahia, 1984).

Une première approche développée par Comninou et Yannas (1976) pour le tendon consiste à modéliser les fibrilles de collagène telles des poutres sinusoïdes dotées d'une élasticité linéaire sans égard pour la géométrie convolutée des fibrilles. Ce modèle fibrillaire ainsi que la fraction volumique de ces fibrilles conduisent à une relation contrainte *versus* déformation des tissus mous. Suivant ce modèle, Manschot et Brakkee (1986) ont obtenu une relation contrainte *versus* déformation de la peau *in vivo* en traction uniaxiale. Ceux-ci ont construit cette relation en «linéarisant» une théorie de déformations finies des poutres. Les restrictions de ce modèle se situent au niveau de la configuration géométrique constante des fibrilles de collagène (hypothèse de Comninou et Yannas, 1976) et à cause de la linéarisation, l'application de ce modèle est confinée aux champs de petites déformations ($\varepsilon \approx 10^{-2}$) (Woo *et al.*, 1993).

Bien qu'une fibrille de collagène offre une grande rigidité (voir §2.1.2.6), il est admis que tant qu'elle n'a pas été redressée, cette rigidité n'est pas déployée. Plusieurs chercheurs ont mis de l'avant des modèles de déformation fibrillaire tenant compte de ce phénomène de redressement («*sequential straightening*») suivant les angles de convolution des fibrilles (Kastelic *et al.*, 1980; Markenscoff et Yannas, 1979) ou suivant des seuils d'allongement menant au redressement des fibrilles (Decraemer *et al.*, 1980a; Kas'yanov et Mungalov, 1985; Lanir, 1979; 1983; 1996; Shoemaker *et al.*, 1986; Soong et Huang, 1973; Wijn, 1980). Même si plusieurs de ces modèles n'ont pas été validés sur la peau, plusieurs d'entre eux permettent d'expliquer avec succès les courbes contraintes-déformtions de tissus mous comparables à la peau. Parmi ces modèles, le plus représentatif du tissu cutané est celui décrit originalement par Lanir en 1979. Par la suite, Lanir a proposé une approche structurelle générale pour la description de tissus mous fibreux tridimensionnels en termes de déformations finies (1983; 1994; 1996).

L'approche structurelle de Lanir (1994; 1996) vise à décrire les interactions mécaniques entre deux points matériels adjacents d'un système binaire «osmotiquement» actif, au moyen des contributions combinées des fibres et de la pression du fluide *in situ*. Conséquemment, la réponse en contrainte (σ) transmise par ces systèmes binaires co-habitant le même milieu peut être modélisée par la relation tensorielle suivante:

$$\sigma = \sigma_f(\mathbf{E}) - P\mathbf{I} \qquad [Pa]$$

où $\sigma_f(\mathbf{E})$ est la contrainte due à la rigidité axiale des fibres du système tissulaire, $\mathbf{E}$ est le tenseur de déformation de Green, et P est la pression du fluide à l'intérieur des pores du système— $\mathbf{I}$ étant une matrice unitaire.

Selon Mizhrahi *et al.* (1986: cités dans Lanir, 1996), la réponse des tissus mous subissant un chargement instantané peut-être modélisée par trois stades. *Primo*, la réponse instantanée est élastique et déterminée uniquement par $\sigma_f(\mathbf{E})$ et le tissu est incompressible; il n'y a pas de mouvement relatif du fluide relativement aux fibres. *Secundo*, la réponse suivant l'application du chargement est dépendante du temps (voir fluage au §2.3.5) et le volume du tissu est réduit relativement à l'écoulement du fluide. *Ultimo*, le fluide et les fibres atteignent un état d'équilibre statique: la pression hydrostatique P est équilibrée à chaque point du système par la pression osmotique du fluide ($\Psi(c)$) où c est la concentration des agents osmotiques (voir §2.1.4) du système tissulaire. À l'équilibre, la réponse en contrainte (σ) transmise par ces systèmes binaires est décrite par la relation suivante:

$$\sigma(\mathbf{E}, c) = \sigma_f(\mathbf{E}) - \Psi(c)\mathbf{I} \qquad [Pa]$$

À cet équilibre, la fonction d'énergie de déformation totale (W_t) du système tissulaire peut être aussi représentée par deux termes: l'énergie de déformation de toutes les fibres du tissue (W_f) découlant de $\sigma_f(\mathbf{E})$ (Lanir, 1994) et l'énergie de déformation du fluide (W_Ψ) découlant de $\Psi(c)$ (Lanir, 1996):

$$W_{total} = W_f(\mathbf{E}) + W_\Psi \qquad \left[\frac{N \bullet m}{m^3}\right]$$

Sachant que l'on puisse généralement mesurer W_{total}, de quelle façon détermine-t-on les deux autres termes d'énergie de déformation de la structure binaire? D'une part, l'approche structurelle définie par Lanir (1979) pour $W_f(\mathbf{E})$ peut reposer sur deux modèles conceptuels: le HDCL («*high density crosslinks*») ou le LDCL («*low density crosslinks*») (Lanir, 1979).

Dans le modèle HDCL, les fibrilles de collagène sont d'important calibre et leur ondulation est modélisée par de nombreuses réticulations avec des fibres élastiques maintenues en tension (figure 2.16c). En conséquence, les fibrilles de collagène sont

pliées suivant plusieurs segments— un segment porte aussi la dénomination «unité» Lanir (1979)— délimités par deux réticulations collagène-élastine (figure 2.16a).

L'analyse d'une unité (figure 2.16c) permet de déduire le rapport d'allongement permettant le redressement d'une fibrille de collagène (λ_R):

$$\lambda_R = \frac{\ell_2}{\ell_f}$$

où ℓ_2 est la longueur du segment de collagène et ℓ_f est la longueur de l'unité— toujours équivalente à la longueur du segment d'élastine (ℓ_1). Le λ_R est différent pour chaque unité car l'ondulation des fibrilles est irrégulière (figure 2.16c). C'est cette variabilité de λ_R qui cause le *sequential straightening* des fibrilles de collagène. Lors de l'allongement du système fibrillaire (λ_f) du modèle HDCL, la rigidité du système est systématiquement supportée par la portion d'élastine des unités. Graduellement suivant l'augmentation de λ_f ($\lambda_f > \lambda_R$), la portion de collagène des unités se redressera ajoutant ainsi à la rigidité de l'élastine. Selon Lanir (1979) et Decreamer *et al.* (1980a), ce phénomène de redressement des fibrilles de collagène évalué à l'échelle du tissu peut être régi par une densité de probabilités de fibrilles redressées représentée par une fonction de recrutement ($R(\lambda_f)$) (*i.e.* distribution Gaussienne normale):

$$R(\lambda_f) = \frac{e^{-\frac{(\lambda_f - \mu_R)^2}{2SD_R^2}}}{SD_R\sqrt{2\pi}}$$

À une valeur moyenne de λ_R (μ_R), la moitié des unités est redressée et la déviation standard (SD_R) présente la rapidité à laquelle ces unités sont recrutées.

De plus, dans les tissus membranaires comme la peau, les unités fibrillaires du modèle HDCL sont distribuées selon différents angles d'orientation (ϕ) en rapport à un axe fixe. La distribution angulaire des unités d'un tissu peut être définie par une autre densité de probabilités des fibrilles représentée par une fonction de distribution angulaire ($D(\phi)$) (*i.e.* distribution Gaussienne normale):

$$D(\phi) = \frac{IA}{\pi} + (1 - IA)\frac{e^{-\frac{(\phi - \mu_A)^2}{2SD_A^2}}}{SD_A\sqrt{2\pi}}$$

Le premier terme de $D(\phi)$ est une distribution angulaire uniforme où IA est une intensité angulaire. L'orientation angulaire moyenne (μ_A) et sa déviation standard (SD_A) sont les

autres caractéristiques qui complètent la fonction de distribution angulaire du modèle HDCL.

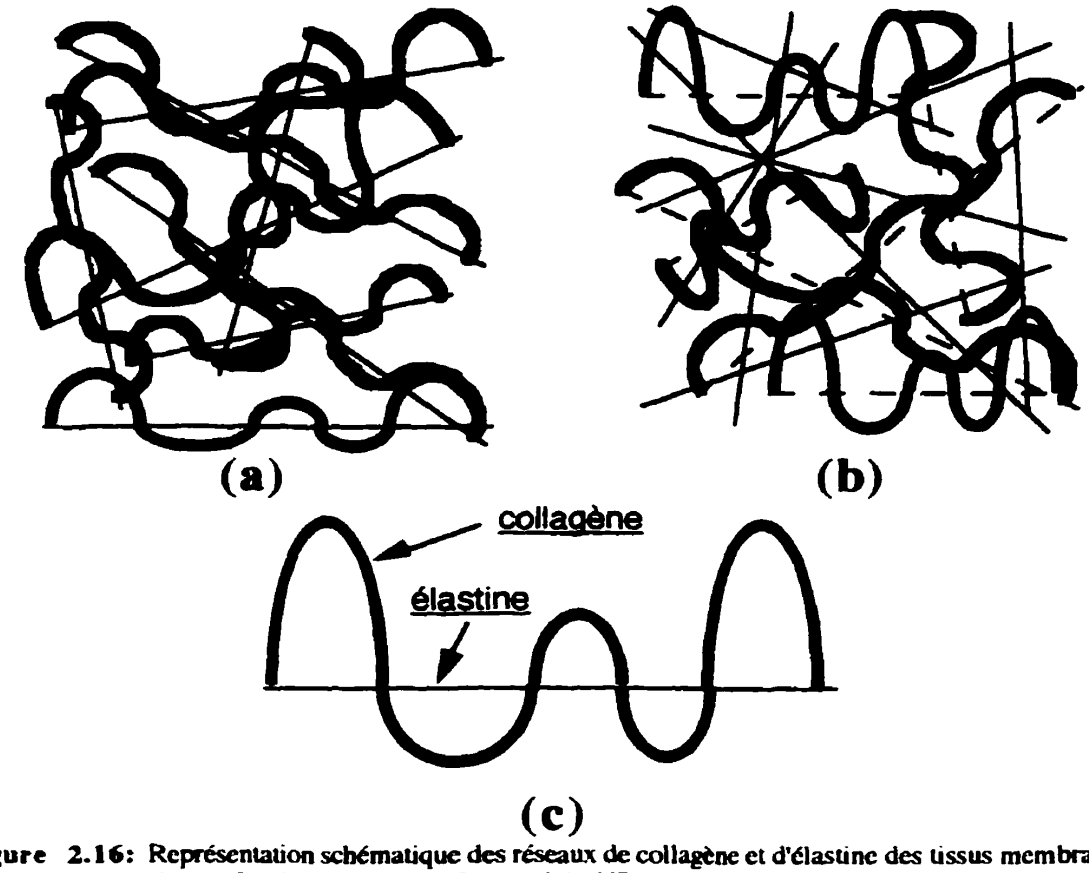


Figure 2.16: Représentation schématique des réseaux de collagène et d'élastine des tissus membranaires telle que proposée par Lanir (1979). (a) Le modèle HDCL (*«high density crosslinks»*) où les fibres élastiques induisent l'ondulation des fibrilles de collagène; (b) Le modèle LDCL (*«low density crosslinks»*) où l'ondulation des fibrilles est inhérente au collagène; (c) Le segment d'une fibrille de collagène où l'ondulation est induite par l'élastine. Élastine (—; 1); Collagène (—; 2); Direction des fibres de collagène (----).

Dans le modèle LDCL, la convolution (ou l'ondulation) des fibrilles de collagène serait issue de l'organisation macromoléculaire ou sous-fibrillaire (voir §2.1.2.3) du collagène (Lanir, 1979). Contrairement au modèle HDCL, l'élastine constitue un réseau relativement indépendant des fibrilles de collagène puisqu'elle contient un nombre limité de réticulations avec ces fibrilles (figure 2.16b).

De façon similaire au modèle HDCL, le λ_R permettant le redressement d'une fibrille de collagène est différent pour chaque fibrille et cause ainsi un *sequential straightening* régi

également par une fonction $R(\lambda_f)$. On présume dans le cas du collagène que la force nécessaire au redressement des fibrilles est négligeable par rapport à celles transmises par les fibres élastiques et les fibrilles de collagène redressées.

Cependant, dans le modèle LDCL, il y a autant de fonctions de distribution angulaire ($D_k(\phi)$) qu'il y a de types de fibres (k) (*e.g.* élastine et collagène; voir figure 2.16b).

Selon Lanir (1979), les observations histologiques de la structure de la peau favoriseraient l'application du modèle HDCL, tandis que celles de la structure des équivalents cutanés avantageraient l'application du modèle LDCL.

Dans le cas des modèles HDCL et LDCL, la formulation constitutive relève de deux grandes hypothèses (Lanir 1979; 1983; 1994; 1996):

A— La déformation uniaxiale que subit une fibre est une fonction de la déformation macroscopique ($\mathbf{E}$, Green-Lagrange) dans la direction axiale de la fibre.

B— L'énergie emmagasinée par une fibre due à une déformation est strictement une énergie de déformation uniaxiale associée à la contrainte et la déformation uniaxiales le long de chaque fibre. La rigidité présentée par chaque fibre (K_k en Pa) est linéaire. Le cisaillement et la flexion de la fibre sont négligés— une approximation raisonnable pour de longues fibrilles de petit calibre. L'énergie de déformation des charges transversales (*e.g.* compression excessive) est aussi négligée.

Ainsi, $W_f(\mathbf{E})$ du modèle LDCL peut être dérivée du potentiel élastique de k-types de fibres (w_k) pour un volume non-déformé de tissu. Pour la peau, cette fonction est approximée par une fonction d'énergie de déformation ($\bar{W}_f$) de k-types de fibres pour une surface non-déformée où $W_f = \bar{W}_f / h_0$. Cette fonction est décrite par la sommation suivante:

$$\bar{W}_f(\mathbf{E}) = h_0 \int_\phi \sum_k S_k^0 \bullet D_k(\phi) \bullet w_k(\varepsilon_f)\, d\phi \qquad \left[\frac{N \bullet m}{m^2}\right]$$

Dans cette expression, h_0 est l'épaisseur initiale du tissu et S_k^0 est la fraction volumique initiale des fibres de type-k.

En se rapportant à une fibre d'élastine ($k = 1$) subissant une traction uniaxiale, la contrainte et l'énergie de dérmation de la fibre équivalent respectivement à:

$$T_1(\lambda_f) = T_1(\lambda_f - 1) \equiv K_1\varepsilon_f \quad [Pa]$$

$$w_1(\lambda_f) = \int_1^{\lambda_f} T_1(\lambda)\, d\lambda = \frac{K_1}{2}\left(\lambda_f^2 - \lambda_f + 1\right) \quad \left[\frac{N \bullet m}{m^3}\right]$$

où $\lambda_f = \ell/\ell_1$ et ℓ_1 correspond à une longueur de la configuration initiale non-déformée du spécimen (ℓ_0).

Pour les fibrilles convolutées de collagène ($k = 2$) subissant une traction uniaxiale, $T_2(\lambda_f)$ et $w_2(\lambda_f)$ sont nulles pour $\ell \leq \ell_2$. Lorsque $\ell > \ell_2$, $T_2(\lambda_f)$ et $w_2(\lambda_f)$ équivalent respectivement à:

$$T_2(\lambda_2) = K_2\left[\frac{\lambda_f}{\lambda_R} - 1\right] \equiv K_2\varepsilon_2 \qquad [Pa]$$

$$w_2(\lambda_2) = \int_1^{\lambda_2} T_2(\lambda_2)\, d\lambda_2 \equiv \frac{K_2}{2}\left[\frac{\lambda_f^2}{\lambda_R^2} - 2\frac{\lambda_f}{\lambda_R} + 1\right] \quad \left[\frac{N \bullet m}{m^3}\right]$$

où $\lambda_R = \ell_2/\ell_0$. Il est aussi possible de déduire une formulation générale de $w_2^{\bullet}(\lambda_f)$ en assumant un recrutement séquentiel:

$$w_2^{\bullet}(\lambda_f) = \frac{K_2}{2}\int_1^{\lambda_f} R_2(x) \bullet \left[\frac{\lambda_f^2}{x^2} - 2\frac{\lambda_f}{x} + 1\right] dx$$

À prime abord, une démarche commune aux deux modèles (HDCL et LDCL) consiste à établir le rapport d'allongement des fibres (λ_f) à partir des déformations macroscopiques finies du tissu ($\mathbf{E}$, selon Green-Lagrange) dans un système de coordonnées curvilignes (ξ_1, ξ_2) (Kas'yanov et Mungalov, 1985; Lanir, 1979; 1983; 1994; 1996). Selon la géométrie du tissu et sa configuration déformée, l'expression représentant λ_f est variable et son interprétation géométrique est complexe.

D'autre part, pour W_Ψ,

$$dW_\Psi = \Psi(c(J))\, dJ \qquad \left[\frac{N \bullet m}{m^3}\right]$$

où J est le rapport volumique (V/V^0) du spécimen étudié (dans la configuration initiale $J=1$). Tel que proposé au §2.1.4, la pression osmotique $\Psi(c)$ est approximée par le modèle d'équilibre de Donnan (Buschmann et Grodzinsky, 1995; Lanir, 1994; 1996):

$$\Psi(c) = 2\Re T^{ABS} c_{ex}\left[\left(\frac{c}{4FAR^2 c_{ex}^2}+1\right)^{1/2}-1\right] \qquad [Pa]$$

où $\Re$ est la constante des gaz (8.314 J(K•mol)$^{-1}$), T^{ABS} est la température absolue (Kelvin), c_{ex} est la concentration ionique du bain externe (~0.15 M), et FAR est la constante de Faraday (94.487 coul•mol^{-1}). La courbe de $\Psi(c)$ de ce modèle *versus* la concentration des PGs révèle une courbe convexe (voir figure 2 de Buschmann et Grodzinsky, 1995). Cependant, l'existence d'effets entropiques («*thermal motion of matrix macromolecular segments*») et d'exclusion volumique des PGs et GAGs est aujourd'hui reconnue et leur amplitude peut être extrapolée afin d'estimer Ψ qui ne peut pas être explicitement quantifié par la concentration d'agents osmotiques (Kovach, 1995; Urban *et al.*, 1979).

Plus récemment, Buschmann et Grodzinsky (1995) ont proposé un modèle de $\Psi(c)$ basé sur l'ultrastructure des GAGs. La formulation de ce modèle repose sur le modèle de Poisson-Boltzmann. Suivant cette approche, Buschmann et Grodzinsky (1995) ont par ailleurs rapporté une surestimation de $\Psi(c)$ relativement à l'usage du modèle d'équilibre de Donnan.

Telle que décrite par Mizhrahi *et al.* (1986: cités dans Lanir, 1996), la réponse suivant l'application d'un chargement instantané est dépendante du temps et le volume du tissu est réduit relativement à l'écoulement du fluide. Si on néglige l'énergie dissipée lors de l'écoulement du fluide, la réponse en contrainte (σ) du système binaire est décrite par le comportement viscoélastique intrinsèque des fibrilles de collagène:

$$\sigma(\mathbf{E}, t) = \sigma_f(\mathbf{E}, t) \qquad [Pa]$$

Plus spécifiquement, ce comportement des fibrilles de collagène est modélisé par l'expression suivante (Lanir, 1979b; 1983):

$$T_2(\lambda_2(t),t) = K_2\int_0^t G(t-\tau)\bullet\frac{\partial}{\partial\tau}\left[\frac{\lambda_f(\tau)-\lambda_R}{\lambda_R}\right]\bullet H(\lambda_f(\tau)-\lambda_R)\,d\tau$$

où $G(t-\tau)$ est une fonction viscoélastique de relaxation réduite de forme générale (Fung, 1972):

$$G(t-\tau) = \frac{\sum C_i e^{-v_i(t-\tau)}}{\sum C_i}$$

et H est une fonction échelon de *Heavyside* qui assure l'intégration temporelle sur $d\tau$ seulement lorsque la fibrille de collagène est redressée. De cette façon, il est aussi possible de déduire une formulation générale en assumant un recrutement séquentiel:

$$T_2^{\cdot}(\lambda_2(t),t) = K_2 \int_1^{\lambda_f(t)} \frac{R_2(x)}{x} \left\{ \int_0^t G(t-\tau) \bullet \frac{\partial \lambda_f(\tau)}{\partial \tau} \bullet H(\lambda_f(\tau) - x)\, d\tau \right\} dx$$

Quoique Lanir (1979) ait généré d'hypothétiques courbes de contraintes-déformations ressemblant à celles expérimentales des tissus mous (e.g. voir figure 2.12), celui-ci n'a jamais publié de validations de son modèle se rapportant à de véritables données expérimentales de la peau. Compte tenu du nombre de caractéristiques matérielles intégrées au modèle structurel de Lanir (voir tableau 2.15), le succès de la validation de ce modèle exige des expériences biomécaniques variées (macro- et microscopiques), des conditions expérimentales faciles (homogénéité et symmétrie) et des méthodes d'optimisation numérique robustes (e.g. l'algorithme de Levenberg-Marquardt). Jusqu'ici, les applications du modèle structurel de Lanir par Belkoff et Haut (1991) sur de la peau en traction uniaxiale et par Horowitz *et al.* (1988) sur un *myocardium*, ont mené à des résultats significatifs et des interprétations physiques utiles des données biomécaniques.

En empruntant une approche structurelle similaire à celle de Lanir (1979; 1983), Shoemaker *et al.* (1986) ont mis en œuvre des expériences afin de définir une relation constitutive bidimensionnelle pour la peau. *Ultimo*, la relation rapportée par Shoemaker *et al.* (1986) s'est avérée empirique d'une forme qui n'est pas stictement dérivée d'un modèle structurel. En plus d'être définie par une déformation macroscopique tangentielle, la déformation d'une fibrille serait aussi «corrélée» à une déformation macroscopique qui lui est perpendiculaire. Si la forme de cette relation constitutive a permis d'interpoler avec succès des données expérimentales, en contrepartie, elle n'a pu rapporter des paramètres matériels stables (particulièrement pour les paramètres viscoélastiques). D'ailleurs, cette approche met en évidence un problème découlant de l'amélioration et des raffinements des modèles par empirisme: *i.e.* une structure mathématique trop complexe et conséquemment, un traitement numérique difficile (instabilité du modèle) et coûteux.

Tableau 2.15: Sommaire des caractéristiques matérielles du modèle structurel de Lanir.

Variables	Caractéristiques	Unités
$D_k(\phi)$:	Fonction de distribution angulaire des fibres-k:	—
IA	Intensité angulaire de la distribution uniforme;	rad
μ_A	Orientation angulaire moyenne;	rad
SD_A	Déviation standard de la distribution angulaire.	rad
S_k^0	Fraction volumique initiale des fibres-k	—
K_k	Module d'élasticité linéaire des fibres-k	Pa
C_i, v_i	Constantes de relaxation des fibres-k	—
λ_R	λ nécessaire au redressement d'une fibrille de collagène	— ou %
$R(\lambda_f)$:	Fonction de recrutement des fibrilles de collagène:	—
μ_R	Valeur moyenne de λ_R;	— ou %
SD_R	Déviation standard de λ_R.	— ou %
c	Concentration des agents osmotiques (charges négatives des GAGs)	$\frac{charges^-}{ml}$

Finalement, il faut souligner que la présence de cellules (migration et division) est inhérente aux caractéristiques physiques tissulaires proposées par Lanir (tableau 2.15). Également, l'essence même de ces caractéristiques physiques est fonction de la dynamique cellulaire (contraction, synthèse et dégradation). En ce sens, le choix du modèle structurel de Lanir constitue une approche très intéressante relativement à l'analyse fonctionnelle mécanique des tissus de culture cutanée.

CHAPITRE III
SYNTHÈSE

La fonction mécanique de la peau: supporter des forces de tension

La peau lie les structures internes et simultanément, permet leur mobilité. La peau supporte plusieurs types de forces mécaniques. Sans s'y limiter, ces forces mécaniques concernent surtout les tensions. Cette évidence vient de l'état de tension *in vivo* de la peau observé par Langer (1861). Grâce au derme et au *stratum corneum*, la peau alloue, sans dommage permanent, de grandes distensions multidirectionnelles. D'une part, le derme renferme principalement de l'eau et un réseau de macromolécules dont l'intégrité est assurée par des fibroblastes. D'autre part, le *stratum corneum* est une couche de cellules mortes qui renferme essentiellement de l'eau et des protéines, celles-ci sont en plus grande quantité que dans les couches sous-jacentes de l'épiderme. Il existe donc dans la peau plusieurs composantes qui interagissent entre-elles pour former des réseaux afin de distribuer de façon optimale l'énergie mécanique donnée à la peau sous forme de tensions multiaxiales. Pour le derme, il s'agit du collagène de type I, d'élastine, des GAGs et d'eau; pour le *stratum corneum*, il s'agit de kératines et d'eau. La clé de la fonction mécanique de la peau est donc la compréhension de la relation entre sa microstructure et ses propriétés mécaniques.

Le rôle mécanique des composantes de la peau

La forme fibrillaire ou fibreuse des composantes macromoléculaires de la peau est fondamentale afin de supporter des distensions. Parmi ces macromolécules, le collagène de type I accomplit dans la peau un rôle mécanique majeur. Le collagène de type I s'assemble pour constituer une structure en fibre ou fibrille ondulée. La forme ondulée d'une fibrille procure au collagène une grande mobilité (Hunter et Finlay, 1973; Lanir, 1979ab; 1988; Lapière *et al.*, 1988; Markenscoff et Yannas, 1979; fig. 29: Millington et Wilkinson, 1983). L'angle d'ondulation, le calibre et la densité volumique des fibrilles de collagène sont des quantités qui varient selon plusieurs conditions du derme. Les segments de la fibrille peuvent subir plusieurs rotations avant de donner une forme droite à la fibrille où celle-ci offrira une résistance mécanique. Une fibrille de collagène combine

la résistance en tension et la flexibilité des câbles toronnés d'acier. L'élasticité d'une fibrille de collagène est établie selon une relation *quasi* Hookéenne et surtout quantifiée par un module d'élasticité normalisé d'une fibre de collagène provenant généralement de tendon (Lanir, 1988; Sasaki et Odajima, 1996b). En plus, le domaine élastique des fibrilles appartient à celui des grandes déformations. La résistance mécanique des fibrilles, soit 50—350 MPa, est dans l'ordre de celle de l'acier (Lanir, 1987; Fung, 1993). Par ailleurs, le rôle mécanique de l'élastine est perçu au niveau des faibles forces. L'élasticité des fibres élastiques contenant l'élastine est établie selon un taux d'élasticité très linéaire (.4—1 GPa) (Daly, 1969; Kafka cité dans Jenkins et little, 1974; Lapière *et al.*, 1988; Oxlund *et al.*, 1988; Fung, 1993;). L'élastine est d'ailleurs le plus «élastique linéaire» de tous les matériaux biosolides connus (Fung, 1993). Le taux d'élasticité de l'élastine est approximativement dix fois inférieur à celui des fibrilles de collagène (Daly, 1969; Fung, 1993; Kafka cité dans Jenkins et Little, 1974; Lapière *et al.*, 1988; Oxlund *et al.*, 1988). Sa résistance mécanique en fait une composante négligeable relativement au collagène (Oxlund *et al.*, 1988). Au niveau de la résistance mécanique et de l'élasticité en tension, les GAGs constituent une composante négligeable à l'intérieur du derme. Par contre, le volume hydrodynamique des GAGs confère aux tissus mous comme le derme, une résistance mécanique à la compression (Buschmann et Grodzinsky, 1995; Comper et Laurent, 1978).

Au niveau mécanique, il existe très peu de valeur normalisée décrivant les propriétés des kératines du *stratum corneum*. L'expérience la plus intéressante provient de Lévêque *et al.* (1988) où en utilisant un microsystème, des mesures de forces et d'allongements ont été prises directement sur un cornécocyte (cellules mortes du *stratum corneum*) renfermant les filaments de kératine, et sur les desmosomes qui unissent les cellules de l'épiderme. Concernant les cornéocytes, Lévêque *et al.* (1988) ont pu établir que ces structures sont dotées d'une flexibilité (comportement membranaire), d'un module d'élasticité en traction comparable à celui d'une fibrille de collagène (450 MPa) et d'une extensibilité faisant partie du domaine des grandes déformations. Cette dernière met en évidence le recrutement des kératines et le déroulement des chaînes α des kératines, en chaîne β (Rasseneur *et al.*, 1982; Wildnauer *et al.*, 1971). Cette forme de défrisage des kératines est aussi le propre d'autres molécules intracellulaires comme l'ADN (Strick *et al.*, 1996). Au niveau fonctionnel, les réseaux de kératines des cornéocytes sont toutefois à la merci des desmosomes ponctuels puisque la résistance mécanique de ces structures

intercellulaires devient défaillante au niveau du *stratum corneum* (Lévêque *et al.*, 1988). Conséquemment, la résistance mécanique et le domaine d'extensibilité des cornéocytes demeurent encore des propriétés mécaniques peu connues. D'autre part, l'interaction des kératines avec le contenu en eau du *stratum corneum* joue un rôle fondamental dans l'évolution de l'élasticité et de la résistance mécanique du *stratum corneum* (Blank, 1952; Lapière et Rasseneur, 1988; Park et Baddiel, 1972; Wildnauer *et al.*, 1971). En absence d'eau, le réseau de kératine devient plus dense et les interactions protéine/protéine se multiplient, accroissant ainsi la rigidité et la résistance mécanique du *stratum corneum* .

L'évaluation de la fonction mécanique de la peau: ses difficultés

Il est clair que les contributions mécaniques des composantes disposées en réseau dans la couche dermique et d'autre part, à l'intérieur du *stratum corneum*, sont difficiles à quantifier lorsque la peau subit un allongement. Toutefois, il existe différentes méthodes qui permettent de quantifier la somme de ces contributions. D'abord, quels sont les systèmes mécaniques de mesures utilisés et quelles sont les propriétés mécaniques de la peau? Au chapitre 2, nous nous sommes penchés sur le recensement des systèmes de mesures de propriétés mécaniques de la peau suivant différents modèles cutanés *in vivo* et *in vitro*. Bien sûr, selon Lanir (1987), une procédure «idéale» devrait consister en des tests multiaxiaux *in vivo* utilisant des champs de déformations uniformes, tel que des propriétés mécaniques normalisées pourraient être directement associées aux résultats de ces tests. Jusqu'à présent, il en est tout autrement. Il existe une variété de tests mécaniques qui servent à décrire le comportement de la peau lorsque celle-ci est soumise à de grandes extensions: *e.g.* tractions uni- et biaxiale, succion et torsion. La première difficulté à surmonter concernant ces systèmes mécaniques de mesures est leur manque flagrant de standardisation. Même si les propriétés mécaniques que nous mesurons avec ces tests sont suffisament sensibles pour nous informer sur les altérations ou le progrès de la structure, ou l'état physiologique de la peau, plusieurs de ces propriétés ne permettent pas d'analyses comparatives. De plus, l'interprétation physique de certaines de ces propriétés mécaniques est très complexe surtout dans le cas de champs de déformations non-uniformes. Par exemple, quels sont les mécanismes de déformations qui conduisent à la relation pression-déflexion du système de succion *in vivo* de Cua *et al.* (1990)? Au précédent chapitre, nous avons décrit des comportements plus standards afin de définir la fonction mécanique de la peau: les comportements de contraintes *versus* déformations (*e.g.* charge/décharge, oscillations harmoniques, préconditonnement), de relaxation et de

fluage. Ces comportements peuvent être décrits à l'aide de plusieurs propriétés mécaniques communes à l'étude des matériaux: les modules d'élasticité statique et dynamique, l'énergie de déformation, l'hystérésis, la fonction de relaxation réduite, les déformations décrivant le fluage (instantanée, retardée, permanente), et les propriétés de plasticité (contrainte ultime, contrainte et déformation à la rupture, ténacité). Cependant, comme les calculs conduisant à ces propriétés mécaniques plus standards sont nombreux, ceci a pour conséquence d'amplifier l'erreur sur ces propriétés. Ainsi, l'importance de mesures de plus en plus significatives et reproductibles devient essentielle. Mais aussi la véritable difficulté n'est-elle pas la peau elle-même? L'historique, la conservation, l'environnement, et dans certains cas la préparation des modèles cutanés (animal et humain) constituent des causes évidentes de variabilité des propriétés mécaniques de la peau. La connaissance des propriétés mécaniques de la peau n'est pas avancée si on la compare à celle plus établie des propriétés biochimiques. Aujourd'hui, cet état se traduit sans doute par des difficultés intrinsèques à l'obtention de données significatives et reproductibles de la peau, et par un retard du développement de tissus cutanés de remplacement.

Dans ce contexte de la mécanique cutanée, l'usage d'ÉC représente un net avantage par rapport à la peau dans la mesure où son analyse fonctionnelle conduit à des résultats comparables à ceux de la peau normale humaine. Par exemple, Michel (1995) a déjà démontré que les ÉC offrait une perméabilité sélective comparable à celle de la peau normale humaine. À tout le moins, il est nécessaire de quantifier le décalage qui existe avec la peau normale humaine. En fait, aux plans structurel et fonctionnel, la peau est certainement l'application la plus documentée si on la compare aux autres applications de l'ingénierie tissulaire.

Les équivalents cutanés comme outil d'analyse de la fonction mécanique de la peau

La production d'un derme pour la greffe aux grands brûlés est d'abord ce qui a motivé les recherches dans ce domaine. La perte des fonctions du derme est évidente (Germain et Auger, 1995). Depuis plusieurs années, les cliniciens utilisent des feuillets d'épiderme de culture cultivés *in vitro* de façon à suffire à la régénération de l'épiderme et au rôle de barrière cutanée chez les grands brûlés. Ces greffons épidermiques seuls ne peuvent suffir à la mobilité de l'ensemble des articulations et du visage. De plus, nous croyons

que l'usage d'un derme équivalent combiné à un épiderme de culture aurait pour effet de réduire les contractures de la plaie et d'empêcher la formation de cicatrices hypertrophiques. En ce qui concerne ces dernières, lorsqu'elles sont très apparentes, comme au visage d'un grand brûlé, elles peuvent causer des cas de détresse psychologique grave. Nous croyons aussi que l'usage combiné des composantes du derme avec l'épiderme de culture favoriserait en temps et en qualités fonctionnelles la reprise des greffons.

D'autre part, l'usage des ÉC comporte plusieurs autres avantages au sens que plusieurs propriétés de la structure de ces ÉC sont contrôlées (Auger *et al.*, 1995; Germain et Auger, 1995). Jusqu'ici, la maîtrise de certaines propriétés de l'ÉC a donné lieu à plusieurs découvertes qui concernent la différenciation cellulaire et l'absorption percutanée (pour revue: Michel, 1995). Nous croyons aussi que la maîtrise de propriétés mécaniques de l'ÉC nous procurerait plusieurs avantages dans l'expression de la fonction mécanique de la peau humaine. Nous pensons immédiatement à l'élaboration de nouveaux traitements de pathologies qui touchent la fonction mécanique, au moyen de stimulations mécaniques et/ou avec de nouveaux composés chimiques. Concernant l'intégrité de la fonction mécanique, nous pouvons aussi penser à établir des seuils de tolérance au niveau des stimulations mécaniques et/ou chimiques. Nous l'avons déjà mentionné, la variabilité des modèles humain et animal, et d'autre part, des raisons d'éthique font aujourd'hui que les produits issus de l'ingénierie tissulaire, comme les ÉC, sont devenus le point de mire de plusieurs laboratoires de recherche. Par cette présente étude, nous avons voulu démontrer que les ÉC peuvent être vus comme un excellent nouvel outil d'analyse de la fonction mécanique de la peau.

Les équivalents cutanés de l'analyse fonctionnelle mécanique

Pour notre analyse fonctionnelle mécanique (chapitres 5-7), nous avons évalué quatre modèles d'ÉC constitués d'un derme équivalent combiné à une culture d'épiderme. Nous avons également testé séparément dans nos analyses (chapitres 4-7) plusieurs DÉ. On peut dire sommairement que ces DÉ diffèrent par leur contenu en macromolécules et que la culture d'épiderme diffère selon les conditions de culture utilisées. Tous ces modèles constituent les fruits d'études d'optimisation qui reposent surtout sur des propriétés fonctionnelles du type: différenciation cellulaire et absorption percutanée. Nous désirons prouver avec ces modèles d'ÉC, qu'il est nécessaire de considérer des propriétés de

nature mécanique (consistante avec la fonction mécanique de la peau) à l'optimisation des modèles d'ÉC. Cette appproche nous amène aussi à démontrer que l'analyse fonctionnelle mécanique des ÉC peut constituer un outil objectif d'analyse de la mécanique cutanée pour les traitements pharmacologiques et cosmétiques.

Les modèles de DÉ que nous avons utilisés sont des gels de collagène bovin de type I ou de collagène humain de types I et III renfermant en moindre proportion des GAGs et de l'élastine, dans lesquels nous avons incorporé des fibroblastes. La méthode de production des DÉ de collagène bovin est basée sur celle de Bell *et al.* (1992), tandis que celle des DÉ de collagène humain a été décrit par Auger *et al.* (1995). De cette façon, les fibroblastes sont incorporés dans un gel qui consiste principalement en un réseau hydraté de fibrilles de collagène enchevêtrées (Allen *et al.*, 1984; Tiollier *et al.*, 1990). Lors de la culture du DÉ, les fibroblastes créent une instabilité mécanique à l'intérieur du gel. Les tractions cellulaires des fibroblastes réorganisent les fibrilles de collagène et par conséquent, elles contractent le gel quel qu'en soit la forme, membranaire ou sphérique (Bell *et al.*, 1979; Guidry et Grinnell, 1985; López Valle *et al.*, 1992; Rompré *et al.*, 1990; Tranquillo *et al.*, 1993; Tranquillo *et al.*, 1996; Barocas and Tranquillo, 1997). Ceci a pour conséquence après peu de temps de changer la distribution des fibrilles de collagène et de réduire le volume du DÉ. Dans le cas de géométrie membranaire et planaire comme pour nos DÉ, l'utilisation d'un ancrage périphérique soustrait avec beaucoup d'efficacité la contraction de la surface (López Valle *et al.*, 1992; Michel *et al.*, 1993). La porosité des ancrages permet l'infiltration du mélange collagène/fibroblastes et suivant la polymérisation à 37°C, le gel demeure retenu par l'ancrage sur tout son périmètre. Les tractions cellulaires causent une redistribution planaire des fibrilles de collagène qui constitue un point en commun avec le derme normal humain. Selon ce principe d'ancrage périphérique, la contraction du DÉ se produit selon l'épaisseur. Les ancrages de microfibres de verre tel que décrit par López Valle *et al.* (1992) sont très souples, fragiles et nécessitent l'utilisation de colle pour la fixation au pétri de culture. Les manipulations expérimentales des DÉ ancrés avec ce matériau nécessitent des pétris appropriés (voir figure 4.2) et des colles biocompatibles. D'autre part, les ancrages de fibres de papier, tel que décrit par Michel *et al.* (1993), ne nécessitent pas de colle et leur rigidité relativement à celle des ancrages de microfibres de verre, améliore la manipulation de ces tissus. Le choix d'un ancrage de forme circulaire (de calibre à 25.4 mm de diamètre) que ce soit en microfibres de verre ou de papier, nous a démontré que ces

géométries dotées d'axisymétrie subissent une contraction relativement uniforme (chapitre 5). D'ailleurs, l'usage de cette forme est fréquent dans la réalisation de plusieurs études relatives à notre DÉ (*e.g.* absorption cutanée, différenciation cellulaire, modification du phénotype des fibroblastes). L'usage d'un mélange de collagène humain nous a démontré que cette matrice résultant de ce mélange offre l'avantage de subir une contraction vraiment moins forte que le mélange de collagène bovin plus fréquemment utilisé en culture cellulaire (chapitre 5). La contraction chez les DÉ bovins est parfois si forte qu'une rupture devient imminente. Au chapitre 2 (§2.1.2.4), nous avons aussi relevé le fait que cette contraction est fonction de plusieurs autres facteurs biochimiques.

Selon toutes ces conditions entourant le développement des DÉ, la fragilité de ceux-ci demeure un facteur de premier ordre en ce qui concerne leurs manipulations. Les causes de déchirement du DÉ les plus fréquentes sont les fortes concentrations de forces normales au spécimen (*e.g.* pince) et les tensions de surface. De plus, les forces mises en jeu dans le déchirement des DÉ ne sont pas perceptibles lors des manipulations. Jusqu'ici, la production de DÉ de plus grande dimension et de formes différentes pour les greffes constitue un problème d'optimisation très peu détaillé au niveau des manipulations pétri → plaie.

La croissance de l'épiderme débute lorsque les kératinocytes sont ensemencés à la surface du DÉ ancré. Les kératinocytes adhèrent au DÉ, migrent et prolifèrent afin de former un tapis de cellules sur toute la surface du DÉ. Ensuite, des mécanismes de différenciation chez les kératinocytes s'opèrent pour constituer les couches de l'épiderme. Nous obtenons ainsi l'ÉC ancré cultivé *in vitro*. La différenciation épidermique est beaucoup plus avancée chez les ÉC lorsque ceux-ci sont cultivés à une interface air-liquide comparable à un état physiologique (Auger *et al.*, 1995; Michel, 1995). Au niveau histologique, ceci se traduit par la présence d'un *stratum corneum* (chapitre 5). Cette façon de cultiver l'ÉC s'opère selon une méthode développée par Michel *et al.* (1993) où l'ancrage est tout simplement porté à l'interface air-liquide d'un pétri circulaire muni d'un support concentrique. Les avantages dégagés par cette méthode se situent au niveau de la diffusion des nutriments via toute la surface du DÉ.

En somme, l'ÉC ancré et cultivé *in vitro* est préparé à partir d'un DÉ (fibroblastes incorporés dans un gel de collagène) sur lequel des kératinocytes ont été ensemencés pour

constituer l'épiderme. Cette approche est très avantageuse puisqu'elle ne requiert qu'une petite biopsie de peau normale humaine pour l'approvisionnement en cellules de nombreux ÉC (Germain et al., 1993; Rheinwald et Green, 1975). Une petite biopsie de peau normale humaine possède le potentiel cellulaire pour générer, selon les besoins expérimentaux, un grand nombre de spécimens cutanés soustraits aux variabilités interindividuelles que l'on retrouve chez l'animal et l'humain.

Les ÉC sont-ils vraiment représentatifs de la peau normale humaine? Sur le plan histologique, plusieurs observations concernant les modifications phénotypiques des fibroblastes incorporés dans un DÉ ancré, ont confirmé un alignement des fibroblastes et des fibrilles de collagène ressemblant à celui du derme normal humain (López Valle *et al.*, 1992). De plus, le marquage biochimique de plusieurs protéines de la membrane basale (collagène de type IV, laminine et fibronectine) et de GAGs dans la partie du derme immédiatement sous-jacente à l'épiderme a démontré une bonne organisation structurale chez les ÉC composés de collagène humain (Auger *et al.*, 1995). Le marquage de la transglutaminase (indicateur de la formation d'un *stratum corneum*), de céramides et de la kératine I a pour sa part confirmé une différenciation de l'épiderme des ÉC cultivés à une interface air-liquide, rendant comparable à l'épiderme de la peau normale humaine (Auger *et al.*, 1995). Toutefois dans des conditions d'interface air-liquide, l'activité des gélatinases (indicateur de la dégradation du derme) est accentuée, particulièrement dans le cas de DÉ bovin. Sur le plan fonctionnel, Michel et ses collaborateurs ont rapporté des résultats très comparables à ceux obtenus pour la peau normale humaine en ce qui concerne la sélectivité de la barrière cutanée (Michel *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1997). Cependant, ils ont aussi observé une cinétique de diffusion beaucoup plus prononcée dans les ÉC que dans la peau normale humaine. D'autre part, il n'existe pas réellement dans la littérature de mesures objectives qui concernent la fonction mécanique des ÉC. Or, nous croyons que dans ce contexte, la rélisation d'une analyse de la fonction mécanique apporterait une vue plus objective à la validation des ÉC.

La méthode d'évaluation des propriétés mécaniques des équivalents cutanés

Compte tenu des fonctions mécaniques associées à la peau *in vivo* et des ÉC ancrés et cultivés *in vitro*, nous avons mis sur pied avec l'Université Laval une méthode originale d'évaluation des propriétés mécaniques adaptée aux ÉC (chapitre 4). Comme cette thèse

de doctorat constitue une suite à ce premier travail sur la fonction mécanique des ÉC, nous avons publié en début de thèse une description de cette méthode afin de lui donner plus de visibilité. Comme nous l'avons déjà décrit en introduction, les propriétés de résistance mécaniques et d'élasticité sont des propriétés essentielles à la peau normale humaine *in vivo*, nous avons donc développé une méthode de perforation. Les principales difficultés rencontrées dans l'élaboration d'une méthode objective d'évaluation des propriétés de résistance mécanique et d'élasticité des ÉC sont premièrement, de minimiser le nombre de manipulations sur le spécimen du pétri vers l'instrument de mesure et deuxièmement, d'optimiser l'efficacité de la méthode de fixation du spécimen sur l'instrument de mesure afin de ne pas le léser. Ne l'oublions pas, l'obtention de mesures significatives et reproductibles est essentielle. Tel que nous l'avons décrit pour l'ancrage, notre système de manipulations pertri → instrument et de fixation comporte deux alternatives. Si l'ancrage est solidaire du pétri, nous utilisons un pétri spécial (figure 4.2) que nous avons conçu et possèdant l'avantage de se démonter. Si l'ancrage n'est pas solidaire du pétri (cas des ancrages de papier filtre), nous utilisons une pince circonférentielle (figure 5.1). Dans les deux cas, le module supportant l'ancrage permet de libérer toute la surface supérieure et inférieure des spécimens et devient aisément transférable à l'instrument de mesure *via* son filetage et celui du site de fixation de l'instrument (figure 4.2 et photographie 4.1). Pour la suite, la méthode de perforation consiste en l'application d'un poinçon de Teflon® à tête hémisphérique (de diamètre équivalent à la moitié de celui du spécimen), dans l'axe central et perpendiculaire à la surface des spécimens (photographies 4.2 et 7.2). Les déflexions (Δ) contrôlées du poinçon de même que la force appliquée sur ce poinçon (P) sont enregistrées à l'aide d'équipements précis de l'ordre des micromètres et des milligrammes. Sur le plan fonctionnel, les mesures P-Δ sont consistantes avec la fonction mécanique puisqu'elles sont dérivées d'un état de tension biaxiale des ÉC. L'efficacité de cette méthode est grande si on la compare aux méthodes décrites au chapitre 2 utilisées pour la peau normale animale ou humaine, dont certaines ont déjà été mises à l'épreuve sur des ÉC (Dore et Lafrance, 1989a). Elle est simple, sensible et d'encombrement assez faible par rapport aux autres méthodes pour la peau normale animale ou humaine (Dore et Lafrance, 1989a; 1989b). Elle permet une vue de côté et de dessous de l'échantillon déformé (photographies 4.2 et 7.2). Elle permet aussi d'effectuer les tests dans des conditions d'immersion complète (chapitres 5 et 6).

La résistance mécanique des équivalents cutanés

En premier lieu, nous avons défini à partir de courbes P-Δ des DÉ, des propriétés de résistance mécanique (chapitres 4 et 5). Selon ces courbes P-Δ, la résistance mécanique peut être définie par le point de force *maximum* enregistré (incluant sa déflexion) et le point de force correspondant à la rupture du spécimen (*i.e.* précédant une chute de charge significative, voir chapitre 5). Dans notre analyse fonctionnelle, la connaissance des propriétés de résistance mécanique est absolument nécessaire à l'établissement d'un domaine de distensions où l'ÉC peut reprendre sa forme quand ces distensions cessent. Dans ce domaine, les ÉC affichent différents comportements à caractère élastique (attribué aux réseaux de fibrilles et filaments), à caractère visqueux (imputable à l'écoulement du fluide dans la matrice) et à caractère plastique (attribué aux microruptures de fibrilles et/ou filaments). En conséquence, nous avons établi un ordre de grandeur pour chacune des propriétés de résistance mécanique mentionnées ci-haut. Nos résultats ont démontré que la résistance mécanique des ÉC est due à la qualité de son épiderme plutôt qu'à son DÉ. Cependant, malgré l'excellente qualité histologique (épaisseur du *stratum corneum*) des couches de cellules épidermiques cultivées à une interface air-liquide par rapport aux épidermes cultivés en immersion, il n'est pas clair que leur qualité de résistance mécanique sera précisément accrue. En effet, la résistance mécanique des *stratum corneum* que nous avons évalués, semble se distinguer par un manque de cohésion découlant probablement des desmosomes ponctuels reliant chacun des cornéocytes. Cette idée a d'ailleurs été validée par plusieurs observations histologiques (Lévêque *et al.*, 1988; Wildnauer *et al.*, 1971). En contrepartie, nous pouvons affirmer que l'épiderme cultivé à une interface air-liquide sur un DÉ humain qui est plus résistant que le DÉ bovin aux mécanismes dse gélatinases, offre une plus grande résistance mécanique que tous les autres modèles d'ÉC que nous avons testés. De plus, la résistance mécanique des épidermes ne permet pas de préserver l'intégrité des DÉ étant donné le plus faible niveau d'amplitude de déflexion offert par les DÉ. Dans ce contexte, le DÉ s'avère jouer un rôle de résistance mécanique beaucoup plus modeste en comparaison avec le derme normal humain. Comme nous l'avons décrit au chapitre 2, le faible calibre des fibrilles de collagène pourrait bien être à l'origine de ce résultat. De plus, quoique Tiollier *et al.* (1990) aient mis en évidence par des observations histologiques un calibre de fibrille chez les mélanges de collagène de type I supérieur aux mélanges de types I+III, correspondant respectivement aux mélanges de collagène bovin et humain dans nos expériences, nous n'avons pas détecté de différences significatives au sujet de leur résistance mécanique. En

se fiant à l'adaptation de l'organe dermique *in vivo*, l'absence de *stimuli* mécaniques lors de la maturation du DÉ pourrait bien être à l'origine de la faible progression de sa résistance mécanique.

Le comportement en tension des équivalents cutanés

Au chapitre 2, nous avons établi que les composantes "mécaniquement" importantes des tissus cutanés sont des fibres incorporées dans un fluide "osmotiquement" actif. Dans ce système binaire, l'interaction mécanique entre deux points matériels adjacents est la contribution combinée des fibres et du fluide. Selon Lanir (1996), la réponse mécanique d'un tel système binaire s'explique par la contribution de la rigidité axiale des fibres et de la pression exercée par le fluide dans les pores du tissu. Dans le cas de l'application *quasi* instantanée d'un chargement, la réponse mécanique de ce sytème est assurée par la contribution des fibres puisque peu de temps est alloué au mouvement du fluide. Suivant l'application du chargement, les mouvements du fluide (comportement visqueux du système) se produisent jusqu'à l'obtention d'un nouvel équilibre de forces avec les fibres. Dans le cas de l'application *quasi* statique d'un chargement, la pression du fluide est déterminée par la pression osmotique du système (la concentration d'agents osmotiques (*e.g.* les GAGs)).

Dans de rares circonstances, l'ÉC peut avoir à subir l'application de chargement *quasi* instantanée. Au niveau fonctionnel, les ÉC ont à subir plus fréquemment des chargements qui se rapprochent de l'ordre *quasi* statique. De plus, compte tenu de la faible concentration d'agents osmotiques de nos ÉC, nous avons mis en évidence la contribution des réseaux de fibrilles et filaments au comportement en tension des ÉC, à l'aide de la courbe P-Δ (chapitres 4-6). Nous avons évalué la contribution de ces réseaux à l'aide des taux présentés par cette coube P-Δ ainsi qu'au moyen de l'aire calculée (représentant une énergie de déformation) sous cette même courbe.

Les courbes P-Δ des ÉC dans un domaine de distensions non-invasif présentent un comportement en tension comportant trois phases distinctes, soit le pied de la courbe ou *toe-part*, une phase de transition et une phase linéaire où l'ÉC se rigidifie. Dans la *toe-part*, les ÉC se déforment sous l'influence de forces négligeables. Dans la phase de transition, la charge nécessaire à l'accroissement de la déflexion appliquée à l'ÉC croît selon une relation de puissance. Nous avons établi que cette phase intermédiaire est à

toute fin pratique très courte relativement aux deux autres phases. Dans la dernière phase, nous avons observé une croissance linéaire de P relativement à Δ jusqu'à l'obtention de l'amorce de la rupture du DÉ. Cette mobilité du réseau de fibrilles et de filaments des ÉC perceptible dans la *toe-part* ainsi que l'apparition de cette rigidité dans la dernière phase, constituent des mécanismes de déformation comparables à ceux de la peau normale humaine tel que nous l'avons décrit au chapitre 2.

Nous avons aussi mis en évidence ce comportement en tension à trois phases chez les DÉ et les épidermes constituant les ÉC (chapitres 3-4). D'une part, ce comportement en tension des DÉ est très comparable à celui du derme normal humain (chapitre 2) si on exclut l'échelle de valeur des taux de la courbe P-Δ. D'autre part, ce comportement en tension des épidermes de culture nous apparaît différent de celui rapporté pour l'épiderme normal humain évalué *in vitro* (chapitre 2). Cette différence se situe au niveau d'une *toe-part* beaucoup plus étendue chez nos épidermes de culture. Au niveau fonctionnel, cet état se traduit par une très grande mobilité de la structure des épidermes de culture. Toutefois, nous pensons que cette différence est purement de nature expérimentale. En effet, les recherches conduites sur ce sujet ont tendance à exclure cette *toe-part* de l'épiderme en raison des procédures expérimentales *in vitro* qui nécessitent une mise sous tension servant de repère au début d'un test. Au niveau fonctionnel, le *stratum corneum* de l'épiderme normal humain possède aussi cette *toe-part* dans son comportement en tension appelé "défrisage" macroscopique de la structure, qui rend délicate la détermination de l'origine de l'élongation (Rasseneur *et al.*, 1982). En rapport avec leur rigidité (la phase III), tant les épidermes cultivés en immersion que ceux cultivés en air-liquide nous ont révélé un comportement en tension comparable à celui d'un épiderme peu hydraté (dans l'ordre de 32% d'humidité relative selon Wildnauer *et al.*, 1971).

Suivant les courbes P-Δ du DÉ et de l'épiderme de culture, nous avons aussi établi que leurs phases respectives du comportement en tension n'étaient pas concomitantes. Au moment où le DÉ atteint sa rigidité maximale et se rupture, l'épiderme de culture quitte à peine sa première phase de défrisage macroscopique. Pour de la peau normale humaine *in vivo*, la programmation du comportement en tension de l'épiderme versus celle du derme est peu connue. Est-ce la rigidité du derme ou de l'épiderme qui se manifeste la première? On sait seulement que le comportement en tension de l'épiderme *in vivo* comporterait une *toe-part* beaucoup plus prononcée que celle qui est rapportée par les expériences menées

in vitro. Par ailleurs, l'intensité de la rigidité déployée dans chacune des phases du comportement en tension des DÉ demeure un point défavorable en comparaison avec le derme normal humain.

Au niveau fonctionnel, nous avons établi que l'énergie transmise à un spécimen lors d'un test de perforation est une propriété mécanique des plus importantes afin de décrire le comportement en tension des ÉC. L'énergie intègre toutes les forces externes appliquées au spécimen. C'est pourquoi nous avons étudié cette propriété mécanique dans différents contextes (chapitres 5-7). D'une part, nous avons démontré pour nos modèles d'ÉC que les épidermes de culture requièrent beaucoup plus d'énergie que les DÉ pour atteindre leur état de rupture. En particulier, les épidermes cultivés à une interface air-liquide sur un DÉ humain forment les épidermes les plus tenaces que nous ayons testés. Cet état est incomparable à la peau normale humaine où le derme est un tissu beaucoup plus tenace que l'épiderme. Ceci peut s'expliquer par la plus grande densité du réseau de collagène de même que par le calibre supérieure des fibres de collagène de la peau normale humaine comparativement au DÉ.

Au niveau fonctionnel, la connaissance de l'évolution du comportement en tension des ÉC pour des distensions répétées est fondamentale (chapitre 6). Cette évolution peut être mise en évidence à l'aide du monitoring de plusieurs propriétés mécaniques dont plus particulièrement, les courbes de charge et décharge (P) d'un cycle-rampe de Δ, les valeurs résiduelle et maximale de P dans un cycle-rampe de Δ, et les énergies de charge et de décharge d'un cycle-rampe de Δ. Ces propriétés mécaniques démontrent des changements au comportement en tension des ÉC suivant la charge et la décharge d'un cycle de perforation et selon le nombre de cycles de perforation. Ce résultat est important puisque l'évolution de ces propriétés souligne donc que parler d'élasticité pure au sujet des DÉ est quelque peu abusif.

Dans le cas de l'application répétée de grandes distensions à des ÉC (jusqu'à 75% de la résistance mécanique), l'apparition de microdommages à l'intérieur des réseaux de collagène ou de kératines est prévisible. Même en deça du tiers de la valeur de leur résistance mécanique, les tissus collagéniques subissent des mécanismes de plasticité (Frisen *et al.*, 1969; Viidik, 1968; Viidik, 1973). Selon Viidik, cette plasticité est beaucoup plus prononcée à l'intérieur du premier cycle de charge-décharge. D'ailleurs,

l'apparition d'une charge résiduelle à la suite du permier cycle de perforation des ÉC n'est pas étrangère à l'apparition de plasticité. De plus, c'est à l'intérieur du premier cycle de perforation que les ÉC dissipent le plus d'énergie et subissent le plus grand nombre de microdommages. Ces derniers sont si nombreux au niveau du DÉ qu'ils causent leur rupture. Selon Parkinson et al. (1997), l'accumulation de microdommages aux fibrilles de collagène aurait pour effet de réduire le nombre de fibrilles impliquées dans le maintien de la fonction de résistance mécanique des tissus collagéniques. Après quelques cycles de perforation, les variations des propriétés mécaniques de l'épiderme de culture et du DÉ s'atténuent rapidement: les boucles formées par les courbes P-Δ de charge et de décharge d'un cycle se superposent. Suivant plusieurs cycles de perforation, ces variations ne sont pratiquement plus perceptibles et correspondent à un préconditionnement tel que décrit par Viidik (1968). De plus, nous avons constaté que la décroissance des valeurs maximales de P en fonction du nombre de cycles et du temps que nous présentons au chapitre 6, possède certaines analogies avec un comportement de relaxation associé à la viscoélasticité. Pourtant, dans des conditions *quasi* statiques, les mécanismes de viscosité imputables à l'écoulement du fluide sont généralement négligeables. C'est pourquoi nous avons privilégié l'hypothèse des mécanismes de microruptures des liaisons à l'intérieur du réseau de collagène du DÉ et du réseau de kératines du *stratum corneum* des ÉC.

Chez plusieurs élastomères, cette plasticité, que l'on nomme *strain-softening* (ou effets de Mullins), a pour effet de modifier le comportement en tension (Emery *et al.*, 1997). Par exemple, lors de gonflements répétés d'un ballon de caoutchouc, vous aurez vite fait de constater que ce ballon devient plus souple suivant le nombre d'essais. Le comportement en tension est donc défini à partir de l'historique du tissu. Par exemple, les causes du *strain-softening* chez le myocardium ventriculaire sont associées à des microdommages dépendants des distensions qu'a subies le tissu (Emery *et al.*, 1997). Dans des conditions dynamiques, l'effet du *strain-softening* est aussi perceptible dans le comportement en tension du *stratum corneum* (Rasseneur *et al.*, 1982) Bien que nous n'excluons pas le comportement visqueux des ÉC, nous pensons que le *strain-softening* risque de jouer un rôle beaucoup plus critique dans l'accomplissement de la fonction mécanique des ÉC.

La modélisation du comportement en tension des équivalents cutanés

Selon l'optique établie au début de ce projet, nous avons étudié à l'aide d'un modèle structurel développé par Lanir (1979; 1983; 1996), les liens entre les propriétés

mécaniques du comportement en tension que nous avons évaluées, et les composantes des ÉC (chapitre 7). Nous rappelons que ce modèle vise à assister le développement d'un ÉC "mécaniquement" fonctionnel à l'intérieur d'un groupe de travail multidisciplinaire (voir objectif 4 de la thèse). Dans ce contexte, l'utilisation de quantités dotées d'un sens physique telles que commandées par le modèle structurel de Lanir, est fondamentale dans la compréhension de la relation entre la microstructure et les propriétés mécaniques des ÉC. En détails, ces quantités concernent le type de fibrilles ainsi que l'élasticité, la fraction volumique, la forme et la distribution de chaque type de fibrilles. L'usage de ces quantités physiques est important si on pense que plusieurs d'entre-elles sont employées dans l'analyse histologique d'ÉC.

Nous avons démontré au chapitre 7 que le modèle structurel de Lanir permet de déterminer l'énergie nécessaire à la perforation de gels de collagène, de DÉ et de *stratum corneum*. La formulation de notre problème se lit comme suit: en tout état de déformation, l'énergie emmagasinée dans l'ÉC correspond à l'énergie de perforation donnée à l'ÉC. Selon ce modèle, nous postulons que l'énergie de perforation est emmagasinée dans chacune des fibrilles (filaments) sous la forme d'énergie due à la déformation uniaxiale le long de la fibrille— une approximation très raisonnable pour les fibrilles et les filaments que l'on retrouve à l'intérieur des ÉC. Dans cette analyse, les énergies de cisaillement, de flexion d'une fibrille et de contacts transversaux entre les fibrilles sont négligées car il existe encore très peu de formulation qui les décrivent objectivement. Toutefois, ces énergies seraient beaucoup plus faible relativement à l'énergie de déformation uniaxiale pour un tissu en tension possédant une faible densité en fibrilles.

Suivant l'application du modèle structurel de Lanir aux cas d'ÉC, nous avons constaté que la recherche de la réponse à notre problème posé générait une somme de travaux de recherche non-traditionnels. En premier lieu, ce modèle requiert comme nous l'avons vu au chapitre 2 plusieurs propriétés physiques de la microstructure des ÉC. Pendant son développement, l'ÉC subit plusieurs modifications microstructurales; il n'est pas surprenant de constater que les détails de la microstructure soient de nature qualitative. Jusqu'ici, il existe peu de données relatives aux quantités physiques histologiques des ÉC. En second lieu, l'analyse cinématique des fibrilles (ou filaments) dans un corps sous l'influence de champs de grandes déformations non-uniformes comme la structure

déformée de nos ÉC, est complexe. Cette analyse nécessite l'emploi de déformations finies et de coordonnées curvilignes. Conséquemment, il n'est pas toujours possible de donner une interprétation physique simple de l'expression du rapport d'étirement uniaxial d'une fibrille. En troisième lieu, l'optimisation d'une fonction objective non-linéaire (*i.e.* une sommation de moindre-carrés de l'énergie de perforation *versus* l'énergie emmagasinée) comprenant plusieurs variables et contraintes impliquent l'utilisation de méthodes numériques spécifiques (*e.g.* les méthodes de *sequential quadratic programming*).

À partir des proprétés fonctionnelles mécaniques du comportement en tension des gels de collagène, nous avons pu déterminer à l'aide du modèle structurel, les propriétés physiques de l'ondulation de fibrilles de collagène. Ainsi, nous avons pu établir que le collagène humain (I+III) constituait des fibrilles beaucoup moins ondulées et plus uniformes que le collagène bovin. Comme les fibrobastes qui seront incorporés dans nos gels distribuent des forces de tractions *via* leurs pseudopodes, les caractéristiques d'ondulation d'une fibrille sont importantes surtout quand on pense que sa déconvolution s'effectue en présence de tensions négligeables. Avec ce modèle, nous pouvons aussi démontrer que la proportion d'élastine ajoutée au DÉ humain constitue un réseau libre inactif dans le comportement en tension de ce DÉ.

Pour les DÉ humains ancrés, nous pouvons démontrer que les fibroblastes contribuent de façon significative à la réorganisation des fibrilles de collagène. Du côté de l'épiderme de culture, nous pouvons aussi déterminer la fraction volumique des kératines en réseau du *stratum corneum*, de même que leur niveau d'ondulation et d'uniformité. De plus, la modélisation du comportement en tension de l'ÉC subissant des cycles de charge/décharge répétés nous démontre que les microdommages (*strain-softening*) du *stratum corneum* peuvent être représentés par une décroissance de la fraction volumique de kératines suivant le nombre de cycles.

C'est en exécutant plusieurs optimisations de notre fonction objective que nous avons réalisé toute la portée de l'approche structurelle. Tel que démontré par l'analyse paramétrique de Lanir (1979), on peut saisir objectivement l'influence des quantités physiques attribuées aux composantes sur la fonction mécanique des tissus mous. Dans ce modèle, le rôle mécanique des composantes de l'ÉC y est énoncé de façon objective.

Malgré sa complexité au niveau numérique que nous n'excluons pas, ce modèle structurel constitue un outil de fort potentiel permettant d'optimiser de façon systématique la fonction mécanique des ÉC. Nous pensons également que l'application du modèle de Lanir aux ÉC telle que nous l'avons pratiquée, peut contribuer efficacement à la validation d'observations histologiques de nature qualitative.

Chapitre IV
Article numéro 1

A Method for the Evaluation of Tensile Properties of Skin Equivalents

H. Lafrance[1,2], M. Guillot[3], L. Germain[1,4], F.A. Auger[1,4]

[1] Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Québec, Canada, G1S 4L8

[2] Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux, Institut de Génie Biomédical
École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

[3] Département de Génie Mécanique, Université Laval
Québec, Québec, Canada, G1K 7P4

[4] Département de Chirurgie, Université Laval
Québec, Québec, Canada, G1K 7P4

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Medical Research Council of Canada (MRC) and the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ). We thank Gilles Tremblay for assistance with metrology, Jo-Anne Massé for help with technical work and Claude Marin for photographic assistance.

Journal: Medical Engineering and Physics, Vol. **17**, 537-543

Date de soumission: 6 Juin 1994

Date d'acceptation: 7 Décembre 1994

Sommaire: Cet article présente une nouvelle méthode de mesure pour l'évaluation du comportement en tension d'équivalents cutanés ancrés cultivés *in vitro*. Les manipulations et la préparation des équivalents cutanés sont des causes fréquentes de la variabilité des mesures et du manque d'objectivité dans l'analyse de la fonction mécanique de ces tissus. Un nouveau pétri de culture et un instrument de mesures de perforation y sont décrits. Nous démontrons dans cet arcticle l'efficacité de notre méthode en évaluant les propriétés mécaniques de dermes équivalents ancrés cultivés *in vitro*.

CHAPITRE IV

A METHOD FOR THE EVALUATION OF TENSILE PROPERTIES OF SKIN EQUIVALENTS

4.1 Abstract

In vitro production of anchored skin equivalent is a new therapeutical option for burn patients. A skin equivalent is a combined culture of dermal and epidermal layers. The dermal layer provides important mechanical properties, such as tensile resistance and nonlinear elasticity, to the skin equivalent during its development. Prior to any *in vivo* human transplantation, the tensile properties of cutaneous equivalents have to be evaluated as a function of its structural components, in view of establishing the culture conditions leading to the best mechanical resistance and stretchability characteristics. However, the handling and clamping of skin equivalents are frequent causes of tearing and lack of repeatability in the measuring of tensile properties. A new indentation method involving a specially designed culture dish has been developed to minimize the risk of damage. Using this new culture dish, cutaneous equivalents were installed on an indentation apparatus. The central loading of a spherical tip was transmitted to the central area of a circular anchored cutaneous equivalent and was recorded with tip position. The tests were achieved at a constant low deflection rate of the tip. This new and accurate method gave repeatability in three central load-deflection characteristics of anchored dermal equivalent: the high-modulus (0.15 $g \cdot mm^{-1}$), the central load of rupture (1.49 g), the rupture deflection (0.470 mm). This indentation test is expected to be an efficient tool in the evaluation of various skin equivalent models tensile properties.

Key Words: Collagen gel, dermal equivalent, skin equivalent, tensile properties, indentation.

4.2 Introduction

Biotechnological progress has lead to the *in vitro* production of living skin equivalent (Gallico III, 1990), composed of two layers: the epidermal and the dermal layers[2]. Using Bell's technique, a dermal equivalent (DE) was first recreated by seeding fibroblasts within a collagen gel (Bell *et al.*, 1979). Then, as a second step, a suspension of keratinocytes was carefully deposited on the surface of the DE (Michel *et al.*, 1993) to obtain a skin equivalent (SE). The addition of epidermal cells lead to the formation of an epithelium after several days in culture while the dermal component matured.

The critical step in SE production has been associated to the DE creation. The fibroblasts incorporated into the collagen gel always induce a severe shrinkage of the DE which provokes structural abnormalities (Bell *et al.*, 1979; Rompré *et al.*, 1990). Our group has shown that the DE contraction can be controlled by using a peripheral anchorage (López Valle *et al.*, 1979). The histological analysis demonstrated that anchored DE had a cellular-fibrillar arrangement resembling to a normal human dermal tissue. Thus, this DE was introduced as a potentially new production technique for SE (Michel *et al.*, 1993).

Cultured SE models must be evaluated to determine their biomechanical properties prior to their transplantation on patients. The mechanical performance of SE such as weak tensile strength, nonlinear elasticity and large extensibility, indicates the remodeling of the extracellular matrix induced by cellular mechanisms. Thus, we have conducted our mechanical evaluation on tensile properties. Previous landmark experiments on the *in vivo* tensile state of human skin were conducted through the use of round body awls. The Langer's lines were thus described (Langer, 1978). Later, *in vitro* experiments using a uni-axial extensometer with grips have shown that tensile orientation of the Langer's lines were related to the configuration of collagen network in the dermis (Ridge and Wright, 1966). These experiments showed also the nonlinear behavior of the force-extension relationship of collagen fibers arrangement, in which three distinctive phases of extension were found. Other experiments with an extensometer combined to electron microscopy introduced additional details such as the planar orientation of collagen fibers (Hunter and Finlay 1973) and the mobility of dermal components (Gibson *et al.*, 1965). Furthermore, the uni-axial extensometer method was used to reveal the effects of time-dependent tensile properties which explained the stress relaxation behavior of the skin

(Daly, 1982). The use of uni-axial extensometers was also extended to *in vivo* experiments with substitution of grips by mobile tabs (Stark, 1977; Manschot and Brakkee, 1979; Vogel, 1982). These tabs were attached to the skin using an indentation or a thin film of cement, but structural abnormalities in the clamped skin area had to be considered in the tensile data analysis. *In vitro* experiments were also conducted with bi-axial extensometer apparatus using jaws or staples and silk threads in the skin clamping process (Ragnell, 1954; Lanir and Fung 1974) but loading distributions was subjected to problems associated with gripping. Furthermore, *in vivo* studies of bi-axial tensile properties of skin led to the development of a suction-cup device (Cook *et al.*, 1977) which represented an interesting axisymmetric system of loading. Evaluation of the tensile properties of the human skin have demonstrated that cutting, handling and clamping of the skin to the testing-machine may cause significant errors (Mansour *et al.*, 1993). Despite those errors, it was shown that the structural resilience of skin allowed different clamping techniques while SE may not be amenable to such manipulations. For example, (Delvoye *et al.*, 1991) have used Velcro to create an attachment between rectangular collagen lattices and their measuring device. Other researchers used ring-shaped collagen lattices to avoid clamping problems (Chapuis and Agache, 1992).

The disc-shaped geometry frequently used for SE presented more difficulties than skin biopsies in tensile strength analysis. Due to their embryonic fibrillogenesis and the orientation of collagenous units (Bell *et al.*, 1979; López Valle *et al.*, 1992), DEs were thin, viscous and had weak resistance to tensile forces while they presented a large extensibility. Also, small surface tension induced irreversible damages such as rupture or mechanical instabilities.

The aim of this paper was to describe a new method which ensured continuity, precision and repeatability in the evaluation of the tensile properties measurements of our disc-shaped DE models and applications to SE models. More specifically, our first objective was to develop an efficient handling and clamping procedure and the second objective was to design a tensile testing-machine which induced bi-axial extension for all type of cultured equivalent. Finally, such a method was successfully applied to our anchored DE.

4.3 Overview of the method

This new indentation method illustrated in figure 4.1 was designed to measure tensile characteristics from an axisymmetric loading state of SE considering their preparation and their disc-shaped geometry. The mechanical system developed consists of two important units: a new culture dish and an indentation apparatus. The development of a new circular dish for SE culture was essential for handling and clamping: it offered a secure grip while mechanical evaluation procedures were conducted. Disassembling safely each petri dish component represented a critical step in reaching the previous objectives. The SE support of the culture dish was axially centered with the spherical tip and clamped on the indentation apparatus, see figure 4.1 and photography 4.1. The apparatus includes the motorized control of the tip position with the continuous monitoring of the load distributed to SE. It allows the possibility to perform bi-axial tensile tests of SE i) assays until failure and ii) prolonged time-dependent tests (*e.g.* cycling and relaxation).

4.4 Design of the mechanical system

4.4.1 The indentation apparatus

The apparatus (photography 4.1) was designed to measure the central load-deflection parameters of a disc-shaped SE (figure 4.1). The vertical force was applied centrally to the SE by means of a 12.7 mm-diameter spherical tip. The tip was frictionless and made of hydrophobic Teflon. The apparatus allowed the use of a series of tips which could simulate different tensile state of *in vivo* human skin such as those found over various articular joints.

The indentation apparatus illustrated in photography 4.1 required devices to actuate the spherical tip and measure the central force. The spherical tip of the indenter was mounted at the probing end of a Digimatic Head® 164 micrometer screw (Mitutoyo, Tokyo, Japan) driven by a Slo-Syn® MO61 microstep motor (Superior Electric, Bristol, USA). The 1.8 degree motor stepping and ±0.001 mm resolution of linear micrometer screw movement provided accurate motion control of the spherical tip. The second device was made from

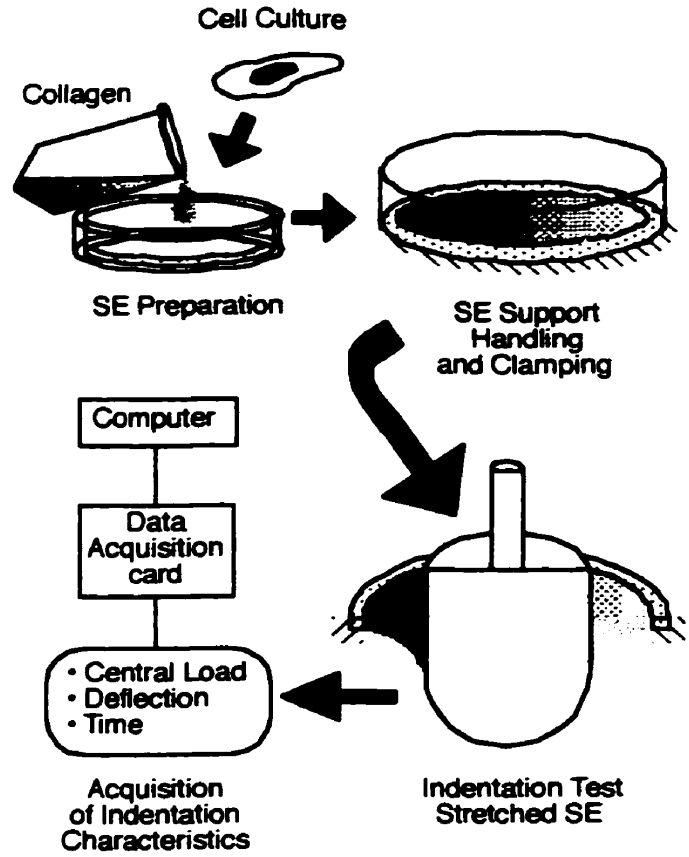
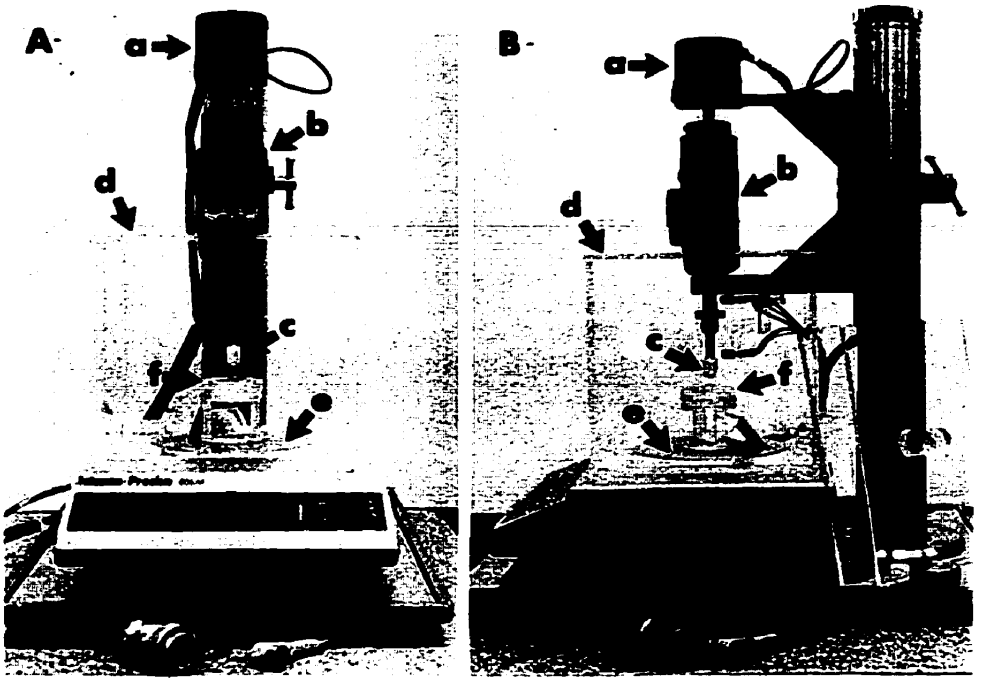


Figure 4.1: Schematic diagram of the method for the evaluation fo tensile properties of skin equivalents (SE).

a tissue support holder connected to a Precisa® balance 800M (PAG Oerlikon AG, Zurich, Switzerland) with analog output. This precision load cell allows linear continuous analog output from 0 to 1 V. The full scale range of this load cell was 808 grams load with ±0.001 g of repeatability and ±0.002 g of linearity. The central load of the spherical tip distributed to SE was transferred to the load cell via the tissue support holder structure. Both devices were mounted on a rigid frame and centrally aligned with tip axis. The specimens were protected from air draft with a transparent acrylic chamber. We assumed for all experiments that the environmental perturbations were reduced by the short duration of each test (32 s per specimen), the constant ambient temperature (±0.5°C) and humidity (lower than 40%) of testing site.



Photography 4.1: Photographs of the indentation apparatus for tensile properties evaluation of skin equivalents. (**A**) front-view showing the microstep motor (a), the micrometer screw (b), the spherical tip (c), the chamber (d), the precision load cell (e) and the tissue support holder (f); and (**B**), side-view of the same components. Vertical displacement of spherical tip induces axisymmetric tension within skin equivalent installed on the tissue support holder and resulting tension within skin equivalent is measured by precision load cell.

4.4.2 Data acquisition system

A data acquisition system, which included a Data Translation DT2901 data acquisition card and IBM PS/2 microcomputer, was used to record analog output of the precision load cell and to add control capabilities. The voltage output was amplified with a 200 gain and was recorded at a rate of 3000 data per second. Use of a 12-bits D/A conversions available in the DT2901 data acquisition card, limited the accuracy of the analog output to ±0.023 mV.

The calibration of the load measurement system was carried out with calibrated weights from zero to 20 g. For each incremental gram, repeatability was tested with twelve load

measurements. The linear regression between load measurement and calibrated weights led to a correlation of $r = 1$ and the maximum load random error on the data acquisition system was ±0.015 mV. From the calibration, the conversion of random error was ±0.012 g.

4.4.3 Culture dish

Improvement in efficiency, accuracy and repeatability for the evaluation of tensile properties of SE was largely associated with the use of a specific culture dish, see figure 4.2. This special dish allowed *in vitro* tissue equivalent production and culture, while afterwards its safe handling and clamping to the indentation apparatus was greatly facilitated.

While designing a new culture dish, some properties should be respected and are similar to those found in the classical tissue culture flask: transparent biocompatible sterelizable materials with smooth and flat surfaces were required for cellular microscopy analysis. A minimal circumferential gap should exist between the lid and the edges of the culture dish in order to allow air exchange while preventing microbial contamination.

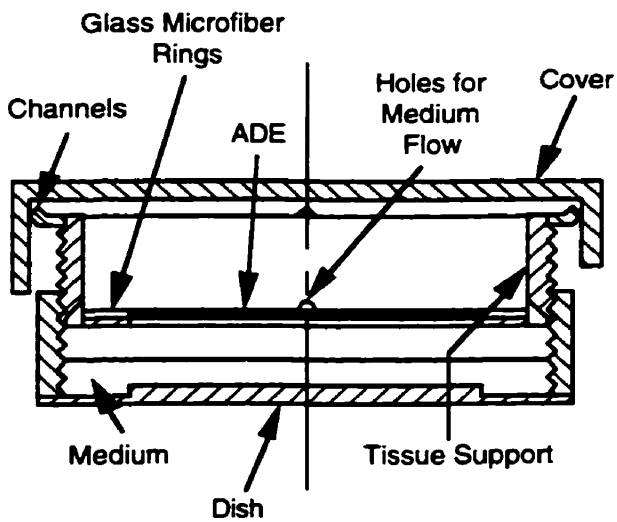


Figure 4.2: Diagram of a splited front-view of the culture dish with anchored dermal equivalent (ADE). The disc-shaped tissue equivalent can be removed from dish with the tissue support.

The culture dish illustrated in figure 4.2 was made up of six components: the cover slip (2), the tissue support (2) and the dish itself (2). All parts were machined from transparent acrylic and assembled using biocompatible silicone. Four axisymmetric empty channels were made on the external upper surface of the SE support to ensure some air exchange and to prevent humidity condensation between coverslip and inner support faces. Four axisymmetric holes were also made near the bottom of the SE support to allow fluid transfer and to eliminate large surface tension at dish bottom-SE interface. Surface tension decreased gradually during fluid insertion at the interface. Fluid insertion was allowed by the pressure differences caused by the rotating ascending movement of support threaded faces.

On the day of the tensile tests, immediately before measurement, the SE tissue support was taken out from the culture dish and screwed onto the tissue support holder which is connected to the precision load cell of the indentation apparatus, see photography 4.1.

4.5 Experimental technique

4.5.1 Anchored dermal equivalents preparation

Twelve anchored DE were prepared to validate our evaluation method of the tensile properties. Fibroblast concentration, collagenous matrix composition and peripheral anchorage were obtained under defined conditions.

Dermal fibroblast primary culture were obtained from a 38 year-old woman's mammary skin biopsy at the time of a reductive breast surgery. The dermal cells were inoculated in minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco) and kept at 37 °C in an 8% CO_2 atmosphere (López Valle *et al.*, 1992). Fibroblasts were used at their fourth passage.

The stock collagen solution was prepared by dissolving acid-extracted type I bovine collagen (type III, Sigma) in 0.001 N acetic acid solution at a concentration of 4.22 mg/ml overnight at 4 °C.

The anchorage system (López Valle *et al.*, 1992) consists of two superposed glass microfiber rings (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, U.K.). Each ring was 4 mm-wide, 0.33 mm-thick and 33 mm-outside diameter, leading to a 491 mm^2 area of disc-shaped anchored DE. Rings assembly was accomplished using epoxy cement (On-the-Spot® #sy-qs). The peripheral anchorage system attached to the bottom of petri dish with the same previously described epoxy cement. Petri dishes were sterilized with ethylen oxide.

Each DE was prepared by mixing of 9.5 ml of the stock collagen solution, 1 ml of fibroblast suspension, 5.6 ml of 2.7X DMEM medium with penicillin/gentamicin and 200 µl of 0.7 N NaOH. A 2 ml volume of the mixture was quickly poured into culture dishes. Collagen polymerization was completed after 15 minutes at a physiological pH 7.4. Culture conditions of the dishes were: 37°C and 8% CO_2. Media changes were done every three days of culture until the test day.

An experimental protocol was established taking into account two parameters which are well known to influence the mechanisms of isometric contraction within anchored DE: the culture period and the initial dermal fibroblast concentration (Bell *et al.*, 1979; Delvoye *et al.*, 1991; López Valle *et al.*, 1992; Chapuis and Agache, 1992). The initial dermal fibroblast concentrations used for DEs were 0.25×10^6, 0.5×10^6 and 1×10^6 cells/ml. This first study was done with 2 DEs seeded with each cell concentration and cultured for two days. Another study was accomplished with four different culture periods (1, 2, 4, 7 days) while maintaining a constant initial fibroblast concentration of 0.25×10^6 cells/ml; DEs were also done in duplicate.

4.5.2 Measurements

Primary tensile tests were carried out for the evaluation of tensile strength. The spherical tip was brought to a definite axial position from anchored DE with the help of the motorized control. For all experiments, we used a quasi-static deflection rate defined at 0.318 $mm \cdot s^{-1}$. Indeed, the biomechanical properties of collagenous tissues are influenced by the strain rate (Fung, 1967). Quasi-static strain rate reduces relaxation of anchored DE and increased adaptation time of collagenous units to extension and realignment.

4.6 Results

4.6.1 Evaluation of the method, measuring mechniques and apparatus

The destructive indentation tests performed on anchored DE led to the description of the typical central load-deflection characteristics at constant deflection rate: twelve punctured specimens were used (see figures 4.3 and 4.4). The central load of rupture, the rupture deflection and high-modulus which is the gradient of phase III (figures 4.3 and 4.4) were the reported data. The central load-deflection relationship could be formulated by exponential or power law expressions because of the appearance of three continuous phases: a low gradient phase, a transitory phase and a high constant gradient phase. We noticed that initial deflection of anchored DE due to gravity, was nil because of the isometric contraction induced in specimen. Furthermore, the extension conditioning of collagenous units was transduced by a low modulus within the first phase. The phase II expressed a lack of mobility of structural units and the modulus was considerably increased. At last, the phase III showed the higher modulus expressed by anchored DE. This region revealed also ultimate central load and deflection which were transduced by a central rupture of DE as shown in photography 4.2. The characteristics of all specimens are presented in figure 4.5.

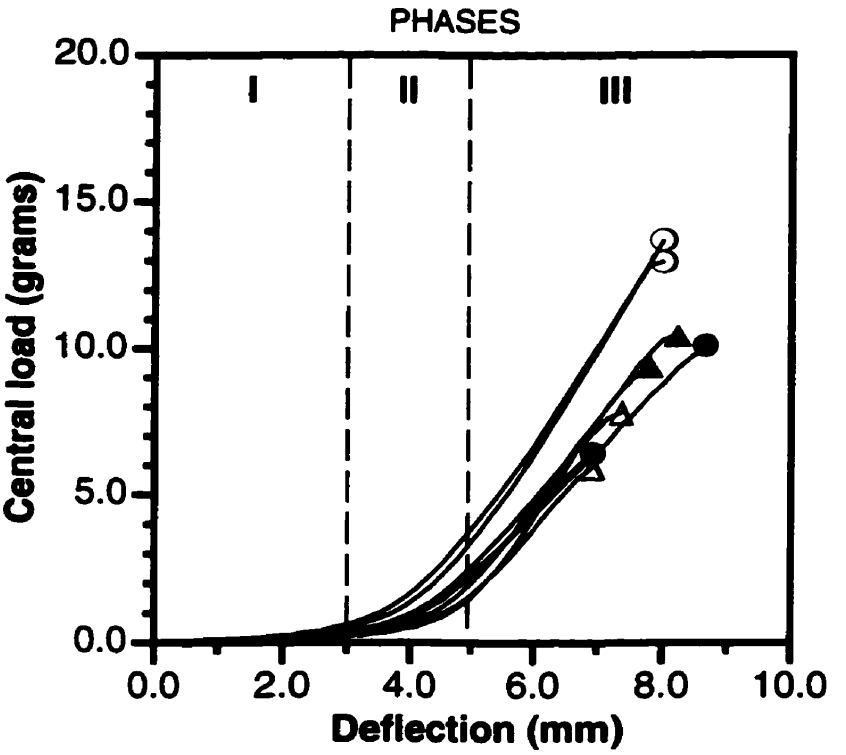


Figure 4.3: Effect of culture period on the central load-deflection curve of disc-shaped anchored dermal equivalents at an initial dermal fibroblast concentration of 0.25 X 10^6 cells/ml. Culture period of tested specimens (symbols were added to distinguish culture periods): ● (n=2) 1 day; ○ (n=2) 2 days; ▲ (n=2) 4 days; △ (n=2) 7 days.

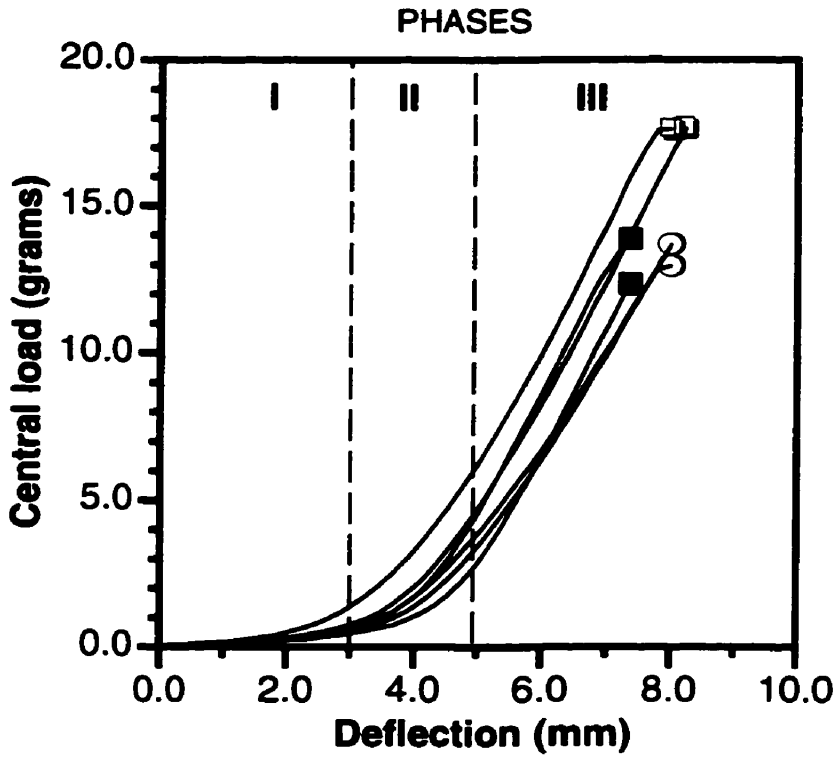
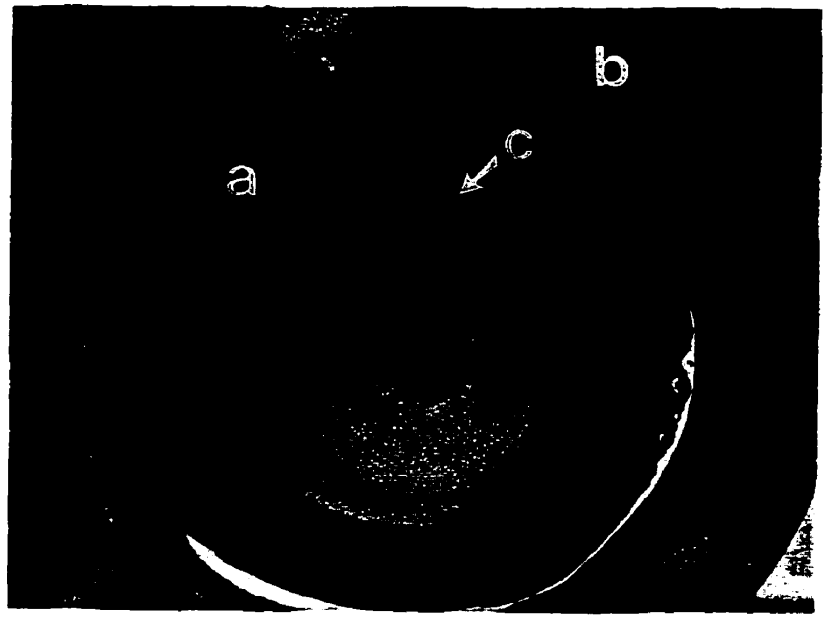


Figure 4.4: Effect of initial dermal fibroblast concentration on the central load-deflection curve of disc-shaped anchored dermal equivalents at a culture period of 2 days. Initial dermal fibroblast concentration of tested specimens (symbols were added to distinguish concentrations): ○ (n=2) 0.25 X 10^6 cells/ml; ❑ (n=2) 0.5 X 10^6 cells/ml; ■ (n=2) 1.0 X 10^6 cells/ml.

In order to estimate the repeatability of our mechanical system in the evaluation of tensile properties of anchored DE, absolute differences between duplicate characteristics were calculated. The averages of these calculations for the high-modulus, the central load of rupture and the rupture deflection were respectively 0.15 g•mm^{-1}, 1.49 g and 0.470 mm. Some noises such as microvibrations were possibly influencing duplicate characteristics but the new method showed more efficiency by taking into account sensitivity of the anchored DEs.



Photography 4.2: Macroscopical view of anchored dermal equivalent rupture during indentation assay. The dermal equivalent (a) anchored to the tissue support (b) has been ruptured by the spherical tip (c). The arrows indicate the edges of a central rupture in the equivalent.

4.6.2 Effects of culture parameters

The preliminary results presented in figure 4.5 indicated a potential influence of the culture period on the mechanical characteristics of anchored DE. They revealed a progression of high-modulus from the first to the second day of culture and a regression of the high-modulus from the second to the fourth day. The same influence of the culture period was observed on the rupture level during experiments. However, no tendency was noted for the rupture deflection of anchored DE. It must be considered that mechanisms of contraction are mostly active during the first to the fourth day of culture, stabilization of the dermal structure is expected after this culture period (López Valle *et al.*, 1992).

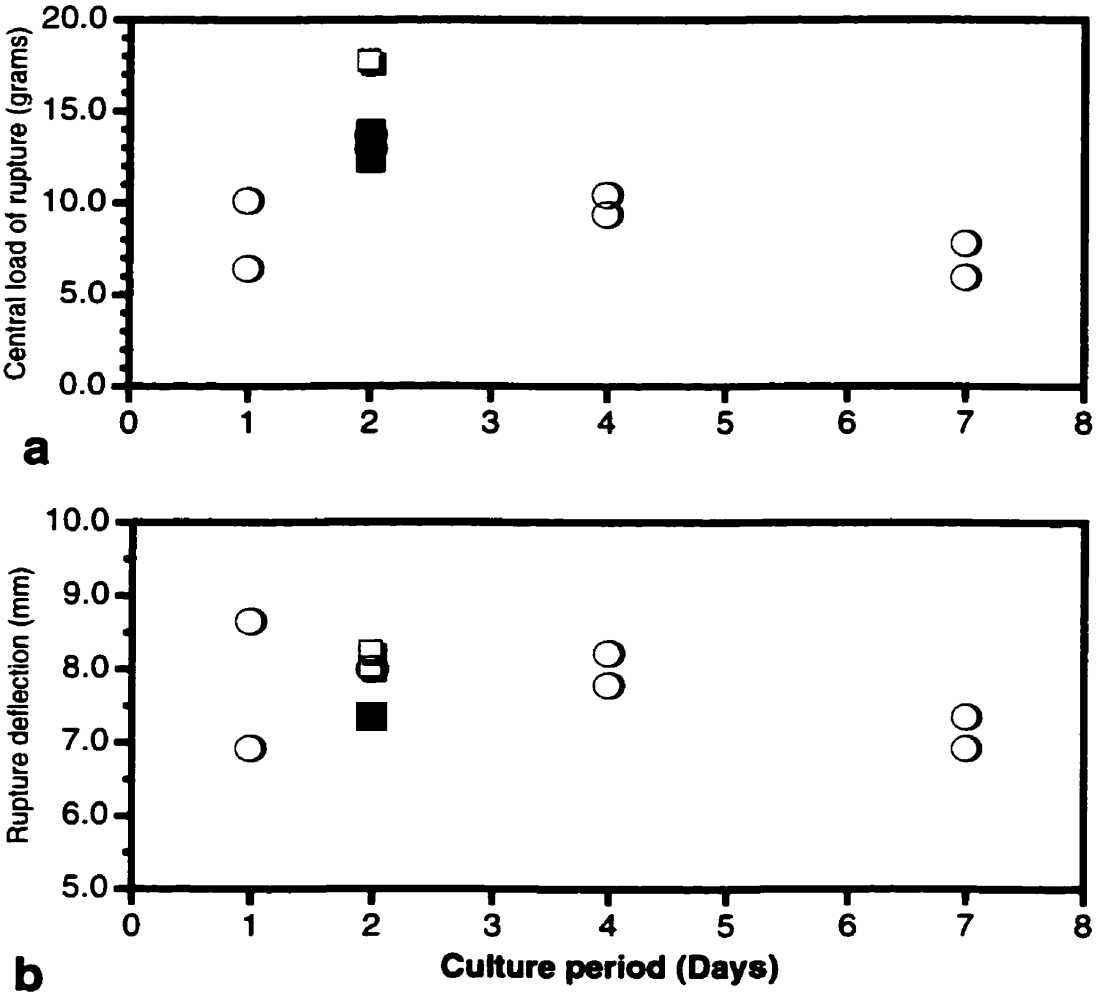


Figure 4.5: Evolution of central load of rupture (a), rupture deflection (b) and high-modulus (c) of anchored dermal equivalents *versus* culture periods (1, 2, 4 and 7 days) and initial dermal fibroblast concentrations (symbols were added to distinguish concentrations): ○ (n=2) 0.25 X 10^6 cells/ml; ❑ (n=2) 0.5 X 10^6 cells/ml; ■ (n=2) 1.0 X 10^6 cells/ml.

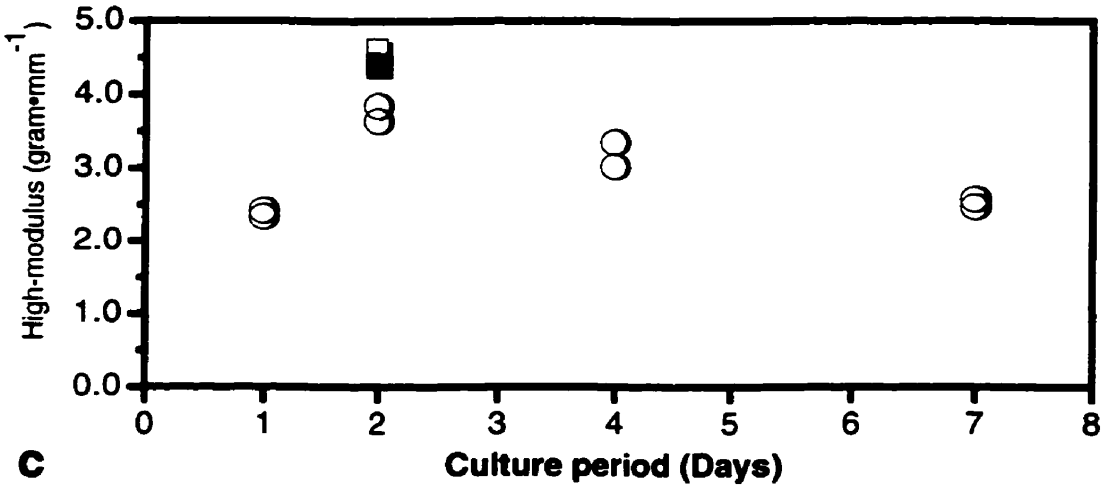


Figure 4.5: Evolution of central load of rupture (a), rupture deflection (b) and high-modulus (c) of anchored dermal equivalents *versus* culture periods (1, 2, 4 and 7 days) and initial dermal fibroblast concentrations (symbols were added to distinguish concentrations): ○ (n=2) 0.25 X 10^6 cells/ml; ❑ (n=2) 0.5 X 10^6 cells/ml; ■ (n=2) 1.0 X 10^6 cells/ml.

In figure 4.5, other results pointed out a potential influence of the three different initial fibroblast concentrations on anchored DE mechanical characteristics. The 0.5 X 10^6 cells/ml cell concentration induced optimal characteristics after 2 days of culture. None of the relationship between these initial dermal fibroblast concentration and characteristics was linear. Thus, excessive number of dermal fibroblasts can cause regression of mechanical characteristics and premature failure of the anchored DE structure.

4.7 Discussion and conclusions

A large variety of *in vitro* and *in vivo* experiments on skin have helped to characterize the tensile physiological functions of the skin (larrabee, 1986). We believe that the new culture dish designed in our laboratory combined to the indentation apparatus described in this paper, have contributed to the evaluation of tensile properties of disc-shaped DE, and will be an efficient tool for the evaluation of SE models. Our culture dish facilitated all the manipulations of such tissue equivalent structures while good reproductibility was obtained . The force measurement and the actuating devices of a spherical indenter

allowed the determination of accurate indentation characteristics: a central load of rupture, a rupture deflection and a high-modulus. The indentation apparatus reveals the meaningful tensile characteristics of the SE models. We also think that the biaxial loading in our indentation test is representative of the physiologically stretched state of the skin.

Measurements of destructive indentation tests performed on anchored DE showed a central load-deflection curve with an exponential pattern. A weak high-modulus (lower than 4.60 $g \cdot mm^{-1}$) and a weak central load of rupture (lower than 17.69 g) were reported. Although, a well known large extensibility of collagenous tissue was measured on anchored DE (i.e. deflection up to 8.658 mm). The exponential curve has been mostly reported from load-extension relationship of collagenous tissues. One of our further points of interest is to transduce indentation characteristics to circumferential and tangential stress-strain characteristics (e.g. constitutive equations). Thus, the indentation test provided good mechanical conditions such as frictionless contact and axisymmetry of whole mechanical system.

According to our results, we also believe that the two parameters presented previously, culture period and initial dermal fibroblast concentration, have induced differences in anchored DE mechanical characteristics. After, the development and in-depth evaluation of the apparatus and mechanical system, we feel that two main area should be further studied: the optimization of tensile properties of the tissue equivalent and the viscoelastic material behavior. Our testing machine can evaluate the recommended viscoelastic tests of Fung (1993): preconditioning, relaxation test, creep test and dynamic cycling. In these cases, our apparatus allows the necessary utilization of a physiological medium chamber to preserve DE or SE during long period. Other geometric analysis such as diameter ratio of tip *versus* specimen characteristics should be also studied in order to generate a better modeling.

On the basis of our data, this new indentation technique will help us to optimize the initial components and the culture conditions of our SE in order to obtain the appropriate mechanical characteristics for clinical use. Thus, it must be always remembered that even if further modifications of collagenous matrix, fibroblast concentrations and culture medium composition (*e.g.* growth factors and attachment peptides) do improve

histological and biological properties of anchored DE, this may also influence deeply its tensile performance.

Chapitre V
Article numéro 2

Study of the Tensile Properties of Living Skin Equivalents

H. Lafrance[1,2], L'H. Yahia[1], M. Guillot[3], L. Germain[2,4], F.A. Auger[2,4]

[1] Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux, Institut de Génie Biomédical
École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

[2] Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Québec, Canada, G1S 4L8

[3] Département de Génie Mécanique, Université Laval
Québec, Québec, Canada, G1K 7P4

[4] Département de Chirurgie, Université Laval
Québec, Québec, Canada, G1K 7P4

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Medical Research Council of Canada, the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, the "Réseau des Grands Brûlés du Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ), the "Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands Brûlés" and the "Fondation de l'Hôpital du Saint-Sacrement". The authors are also grateful to Dr. Francine Goulet for scientific collaboration, Rina Guignard and Nathalie Tremblay for technical assistance and Imedex, Lyon, France for the kind supply of human collagens. We also thank Claude Marin for photographic assistance.

Journal: Bio-Medical Materials and Engineering, Vol. 5, No. 4, 195-208

Date de soumission: 8 Juin 1995

Date d'acceptation: Août 1995

Sommaire: Cet article présente une évaluation de la résitance et du comportement en tension de gels de collagène, de dermes équivalents et d'équivalents cutanés ancrés cultivés *in vitro* à l'aide d'une méthode de perforation développée au chapitre IV. L'usage du collagène humain *versus* celui bovin pour les dermes équivalents, et la condition air-liquide *versus* celle d'immersion pour la culture de l'équivalent cutané sont comparés en utilisant des propriétés mécaniques fonctionnelles : le point de charge maximum, le point de rupture et la ténacité. De plus, la connaissance de la résistance mécanique constitue un préalable à l'étude du comportement en tension des équivalents cutanés subissant des distensions répétées, tel que présenté au chapitre VI.

CHAPITRE V

STUDY OF THE TENSILE PROPERTIES OF LIVING SKIN EQUIVALENTS

5.1 Abstract

The living skin equivalent is one of the more advanced clinical applications in the field of tissue engineering. It is a promising therapeutic option for burn victims and a strong potential for many *in vitro* experiments. However, researchers have encountered major drawbacks in the reconstruction of the dermal layer. Peripheral anchorage of the dermal equivalent component has been a valuable solution to many of these problems. In this work, we have carried out the mechanical analysis of skin equivalent models, based on this dermal anchoring technique, with a study of their biaxial tensile properties. Differences between models were related to the origin of collagen, either bovine or human, and on the culture techniques: immersion or at the air-liquid interface. The study was accomplished *in vitro* using 25.4-mm-diameter disk-shaped specimens with an indentation test. In appropriate wet condition, the specimens were punctured with a spherical tip at a quasi-static rate. We measured the load applied against the tip *versus* deflection up to the breaking point. Our results show that skin equivalents presented a typical exponential load-deflection relationship. All skin equivalents presented large extensibility up to 1.41 expressed in a ratio of deflection vs specimen's radius. The maximum tensile strength (0.871-1.169 Newton) and energy calculations (3.75-6.432 N•mm) was offered by living skin equivalent, made with human types I and III collagens, cultured at the air-liquid interface. In these conditions, our results suggest the tensile properties of living skin equivalents were enhanced due to the development of well stratified *stratum corneum*.

Key Words: Human collagen, dermal equivalent, skin substitute, mechanical properties, tissue engineering.

5.2 Introduction

In the U.S., ten thousands deaths per year are related to the sequellae of burn trauma (Langer, 1993). Nowadays, living skin equivalent (SE) is a valuable method for the treatment of severe burns (Gallico, 1990). Moreover, SE is considered a suitable model for pharmacologic and toxicologic evaluations (Hull *et al.*, 1990; Bell *et al.*, 1991; Langer, 1993; Michel *et al.*, 1993). In fact, a SE is a bilamellar structure as described by Bell and co-workers (1991); i.e. an epidermal cell layer cultured upon a dermal equivalent (DE). On one hand, the epidermal cell layer consists of keratinocyte *strata* that show different levels of cell differentiation with *stratum corneum* being the final result of keratinocytes' differentiation (Michel *et al.*, 1993). These differentiation levels are mainly characterized by cell morphology and phenotype (keratin, filaggrin, etc.). Various pairs of keratins are expressed in the epidermis. They form filaments and dense network within the *stratum corneum* which are responsible for the rigidity of the epidermis (Koutroupi and Barbenel, 1990). The mitosis, migration and differentiation of cells in epidermal layers is in a state of dynamic equilibrium.

The DE is a fibroblast-populated collagen gel. These dermal fibroblasts can increase the rate of proliferation and differentiation of keratinocytes (Coulomb *et al.*, 1989; Pittlekow *et al.*, 1991; Seah, 1992). Various polymeric lattices have been proposed to mimic the role of the dermal extracellular matrix and among them mainly collagen lattices or dermal equivalents, see reviews of Gallico (1990) and Seah (1992). Collagens are secreted by dermal fibroblasts *in vivo* and these macromolecules are the main tension-carrying component of dermis (Lanir, 1987). The mechanical role of collagen network is well known, among others, it withstands tensile forces and allows shape recovery when these tensions are removed from a finite deformed state, it also supplies the rigidity to the cutaneous tissue. Moreover, the specific adhesion sites of collagen maintain dermal fibroblasts in an *in vivo*-like morphology (Elsdale and Bard, 1972; Bell *et al.*, 1991; López Valle *et al.*, 1992). Besides these important features of SEs, there is also numerous cellular considerations like the immunologic neutrality (Bell *et al.*, 1991) and the growth response to various molecules, such as those contained in serums or purified growth factors, which are reported periodically in literature.

In the initial phase of SE culture, a tractional remodeling occurs in planar, either disk-shaped or rectangular, DEs (Bell *et al.*, 1979; Rompré *et al.*, 1990; López Valle *et al.*, 1992; Grinnell, 1994) and it can be observed by a severe shrinkage of the initial dermal surface. The dermal cells embedded in a collagen gel are subjected to mechanical and biochemical instabilities (Stopak and Harris, 1982; Harris *et al.*, 1984) which modify their growth kinetic and metabolism. These instabilities are produced through traction forces which are generated by contractile proteins of cells and the cell-collagen attachments, and cause a tractional remodeling of the collagen gel. Hence, the contraction induced in a floating (non-anchored) dermal equivalent could produce a dramatic structural disorder of the tissue (Bell *et al.*, 1979; Rompré *et al.*, 1990; López Valle *et al.*, 1992; Grinnell, 1994). Recently, experiments using an anchored dermal equivalent have demonstrated that an isometric contraction was beneficial for the arrangement of dermal fibroblasts and collagen fibrils (Bell *et al.*, 1991; López Valle *et al.*, 1992; Germain and Auger, 1995), and epithelial cells (Bell *et al.*, 1991; Germain and Auger, 1995). However, these anchoring techniques caused an important compaction of the dermal equivalents. Nevertheless, these studies based upon histological descriptive observations and biochemical analysis did not report sufficient quantitative detailed data about functionnality of SEs from a mechanical point of view. We believe that the knowledge of mechanical properties may help to optimize the structure of anchored living SEs. We intend to present in this paper the tensile performance of some SEs models.

The major point of interest of this study is the understanding of the mechanical performance of SEs. Our main analysis relates to the biaxial tensile properties which are the *in vivo* loading conditions of the skin. Clinically, we believe that a domain of the biaxial tensile properties should be clearly defined to facilitate handling of SEs and to prevent excessive tensile forces on patient skin grafts. In addition, we also believe that load-elongation relationships could present helpful characteristics for the optimization of burn coverage by SE. Indeed, optimal tensile properties could accelerate the production of SEs which is a primordial advantage in burn treatments, and give a more interesting product as an *in vitro* model. At the present time, few quantitative studies have analysed the relevant mechanical properties of SEs. In general, the mechanical testing conditions used in controls of implantable soft tissue, do not report sufficient precautions to preserve integrity of living tissues. Thus, it is fully justified to use the appropriate conditions for

SEs testing because of their relative fragility and sensitivity to the environmental conditions.

In the present study, we have measured with an indentation test previously described by our group (Lafrance *et al.*, 1995a), the biaxial tensile properties of SEs and DEs. A serie of tests is presented to determine their tensile strength characteristics and to observe their resulting cross-sectional areas. The main analysis parameters were i) the composition of collagen gels in tissue engineered skin, ii) the role of keratinocytes and dermal fibroblasts and iii) the effect of experimental culture conditions.

5.3 Materials and methods

In this work, studies were done on six groups of cultured cutaneous tissues: two dermal models (bDE and hDE+) and four skin models (bSE_i, bSE_{al}, $hSE+_i$ and $hSE+_{al}$). The differences between both DEs are related to the nature of the collagen gels: either composed of bovine collagen ("b" index) or human collagens ("h" index). The bDE and hDE models that we tested, had previously been used in our studies (López Valle *et al.*, 1992; Michel *et al.*, 1993; Auger *et al.*, 1995). Moreover, epidermal cell layers of SEs were cultured according to two techniques: 1. in immersion ("i" index) or 2. at an air-liquid interface ("al" index). The exposure of the epidermal cell layer to air is a necessary condition for a complete differentiation of the epidermal cells (i.e. appearance of the *stratum corneum*; Bell *et al.*, 1991; Michel *et al.*, 1993). Two Cs (bC and hC+) were used as controls.

The geometry of all cultured cutaneous tissues tested was disk-shaped with diameter of 25.4 mm. The geometry was maintained constant until the testing day because of the anchoring technique proposed by López Valle and co-workers (1992). The DE mixtures were poured into usual 35 mm-diameter Falcon® petri dishes (Becton Dickinson, Mississauga, Canada) containing two superposed 25.4 mm-inside diameter rings of filter paper (Whatman, Maidstone, UK). Rings were used as the peripheral anchorages for the DEs. To bring the SEs at the air-liquide interface, Falcon® 3037 petri dishes with a central molded support (Becton Dickinson, Mississauga, Canada) were used as described in Michel and co-workers (1993).

The groups of equivalents prepared with bovine collagen were tested at day-21 while those with human collagens were tested at day-23. During culture, all the DE specimens were kept at 37^0C in 8% CO_2 and 92% air atmosphere and preserved within appropriate culture media.

5.3.1 Human cutaneous cell cultures

Using the technique of Germain and co-workers (1993), human dermal fibroblasts and keratinocytes were isolated from skin specimens removed during reductive breast surgery of healthy subjects. Donor ages were respectively 38 and 18 years-old for fibroblasts and keratinocytes. Cells were cultured according to previous methods (rheinwald and Green, 1975; Bouvard *et al.*, 1992; Auger *et al.*, 1995) and used between their third and fourth passages. For the preparation of DEs, suspension of fibroblasts was set to the concentration of 250 X 10^3 cells/ml of 1X complete Dulbecco-Vogt modification of Eagles' medium (DMEM; Flow Lab., Mississauga, Ontario, Canada) containing: 10% fetal calf serum (Gibco Labs), 100 IU/ml penicillin and 25 µg/ml gentamicin (Sigma). For the preparation of SEs, suspension of keratinocytes was established in 1X complete Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium with Ham's F12 containing: 10% reconstituted newborn calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), EGF and others additives (complete DME Ham) and 90 X 10^3 cells/cm^2 were seeded (Auger *et al.*, 1995).

5.3.2 Dermal equivalent preparations

Dermal equivalents were prepared as described by Auger and co-workers (1995). The mixture of bDE was composed (in the order that follows) of a 2.7X DMEM containing: 40% fetal calf serum (Gibco Labs), 200IU/ml penicillin and 50µg/ml gentamicin (Sigma), a 0.7 N NaOH, a suspension of fibroblasts previously described, and a stock solution of bovine type I collagen (Sigma, Type III) at the concentration of 4.22 mg/ml in 0.001N acetic acid.

Table 5.1: Volumetric composition of bDE; the dermal equivalent was prepared for living skin equivalents: bSE_i and bSE_{al}.

Volume (ml)	Addition
7.0	2.7X DMEM
4.6	Fetal calf serum
0.25	O.7 N NaOH
1.25	Suspension of dermal fibroblasts
11.9	Solution of bovine type I collagen
25.0	(Total)

Note: A 2 ml volume of the mixture was used to produce each specimen.

The components of the second mixture for hDE+ were the same suspension of fibroblasts and DMEM as those used in bDE, 4 N HCl, a stock solution of human types I (63%) and III (37%) collagens (Imedex, Lyon, France) at the concentration of 6.26 mg/ml of apirogen water, a solution of hyaluronic acid from human umbelical cordon at 0.062 mg/ml of apirogen water, a solution of chondroitin sulfate from porcine skin at 0.122 mg/ml of apirogen water, a solution of heparan sulfate from bovine kidney 0.002 mg/ml of apirogen water, and a solution of elastin extracted from bovine neck ligament at 1.336 mg/ml of 0.2M TRIS pH 8.0. The volumetric compositions of bDE and hDE+ are respectively described in tables 5.1 and 5.2. After each DE preparations, the mixtures were rapidly poured in tissue culture dishes. Except for the dermal fibroblast suspension which was substituted by a 1X DMEM solution, both controls, bC and hC+, were prepared with the same respective components as DEs. The first medium change occured on day-2 with the same DMEM solution used for fibroblast cultures, until the addition of keratinocytes.

Table 5.2: Volumetric composition of hDE; the dermal equivalent was prepared for living skin equivalents: $hSE+_i$ and $hSE+_{al}$.

Volume (ml)	Addition
7.0	2.7X DMEM
4.6	Fetal calf serum
0.02	4 N HCl
1.25	Suspension of dermal fibroblasts
1.25	Solution of elastin
1.25	Solution of hyaluronic acid, chondroitin sulfate and heparan sulfate
10.0	Solution of human type I (63%) and III (37%) collagens
25.37	(Total)

Note: A 2 ml volume of the mixture was used to produce each specimen.

5.3.3 Living skin equivalent preparations

At day-4, a 0.4 ml suspension of keratinocytes was layered onto bDE and hDE+ as previously described (Auger *et al.*, 1995). Using a petri dish with a central molded support, the bSE_{al} and $hSE+_{al}$ were raised respectively at day-12 and day-14 to an air-liquid interface until testing. Others bSE_i and $hSE+_i$ were kept immersed during the whole culture period. From day-4 to day-11 for the groups prepared with bC, or to day-13 for the groups prepared with hC+, the medium was complete DME Ham (Auger *et al.*, 1995). During the last nine days of culture at an air-liquide interface, the medium was complete DME Ham without EGF. Medium was changed daily.

5.3.4 Biomechanical testing

The biaxial tension is certainly the primary loading mode for the skin. In this sense, the evaluation of biaxial tensile properties was accomplished with an indentation method developed by Lafrance and co-workers (1995a). Due to sufficient stiffness and strength of the peripheral anchorage, the culture cutaneous tissues were taken out from dishes with surgical tweezers and then, clamped in a circumferential grip (figure 5.1). This grip was especially designed to ensure that the disk-shaped specimen was centered with the load axis of a spherical indenter. The specimens were immersed in DMEM solution (22^0C) containing HEPES to maintain pH at 7.2. The tests were produced using a universal materials tester (Vitrodyne®1000, Liveco, Burlington, USA) which included a precision gram sensor (GS-150, Transducer Techniques, USA). A complex was built with a frictionless spherical indenter, the sensor and the V1000® actuator.

The biaxial tensile tests were performed as follows. The spherical indenter was conducted to a zero central deflection corresponding to the bottom of the peripheral anchorage as illustrated in figure 5.1. To study quasi-static deformed states, the deflection rate was set to 0.200 mm/s which avoided the viscoelastic effects. For all the tests, the indenter was actuated until the specimen were completely punctured. The spherical indentation load (P in Newtons)- central deflection (Δ in mm) curves were recorded.

In this study, we emphasized the tensile strength, the extensibility and the energy needed to puncture the specimens. The tensile strength is the most commonly measured parameter in this type of testing and gives the maximum static force the tissue can withstand. In the indentation test, the tensile strength properties were represented by the maximum loading point expressed by P_{max} (figure 5.2). We have also defined the level of extensibility as the distance by which the specimen was deflected at break point (Δ_{break}) (figure 5.2). The break point was the failure of the specimen and it was set before the P value had fallen below 50% of the P_{max}. Finally, the energy values are from a functional point of view the most important, since external forces are absorbed by the tissue as energy. It is a function of force and distance and it can be calculated from the area between the curve and the Δ-axis (figure 5.2). The maximum energy ($W(P_{max})$ in

N•mm) represents the magnitude of withstandable force. The Simpson's algorithm was used to calculate the energy needed to reach the point of maximum load.

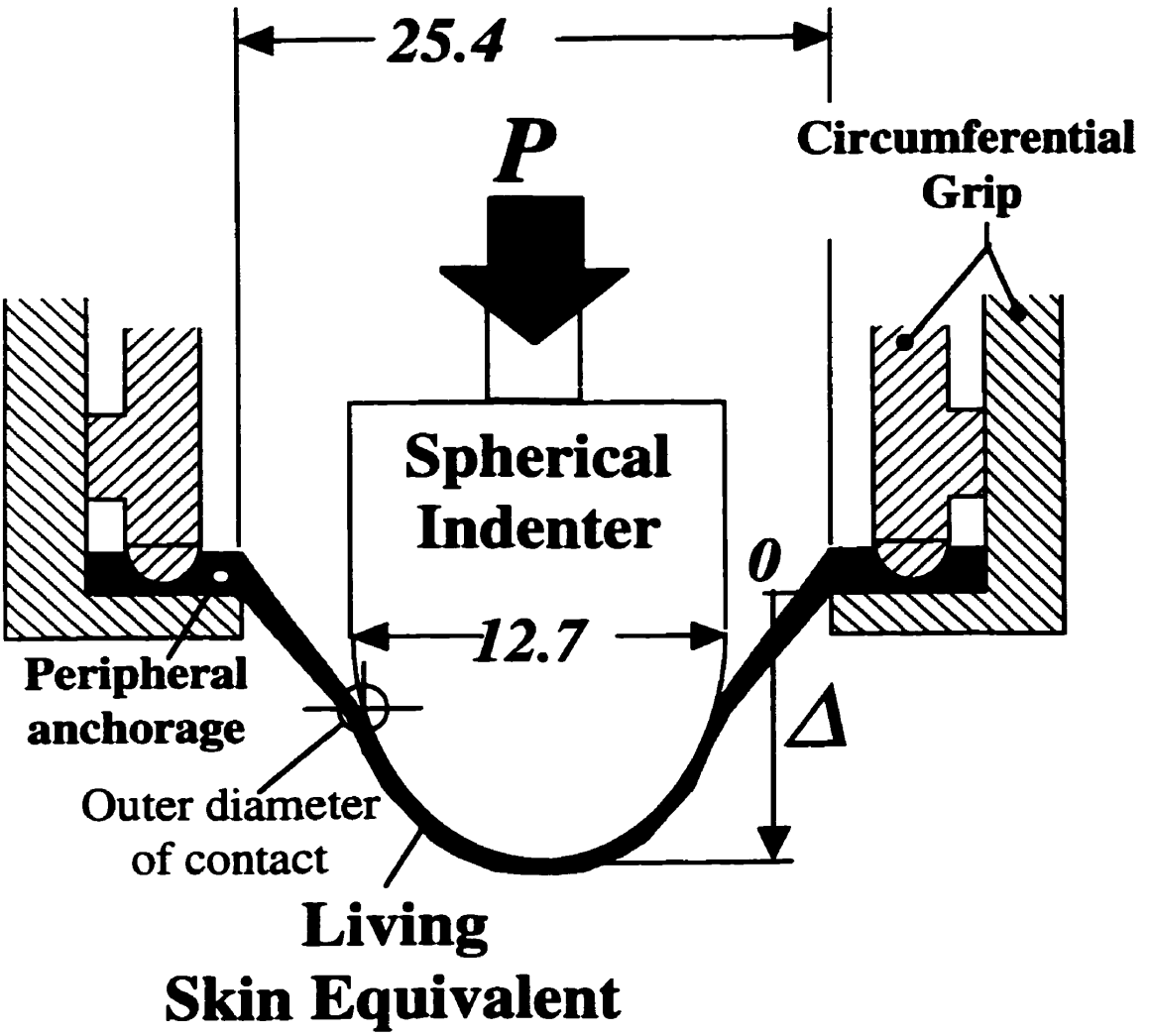


Figure 5.1: Schematic cross-section representation of a cultured cutaneous tissue during indentation. P = spherical indentation load, and Δ = central deflection. All dimensions are in mm.

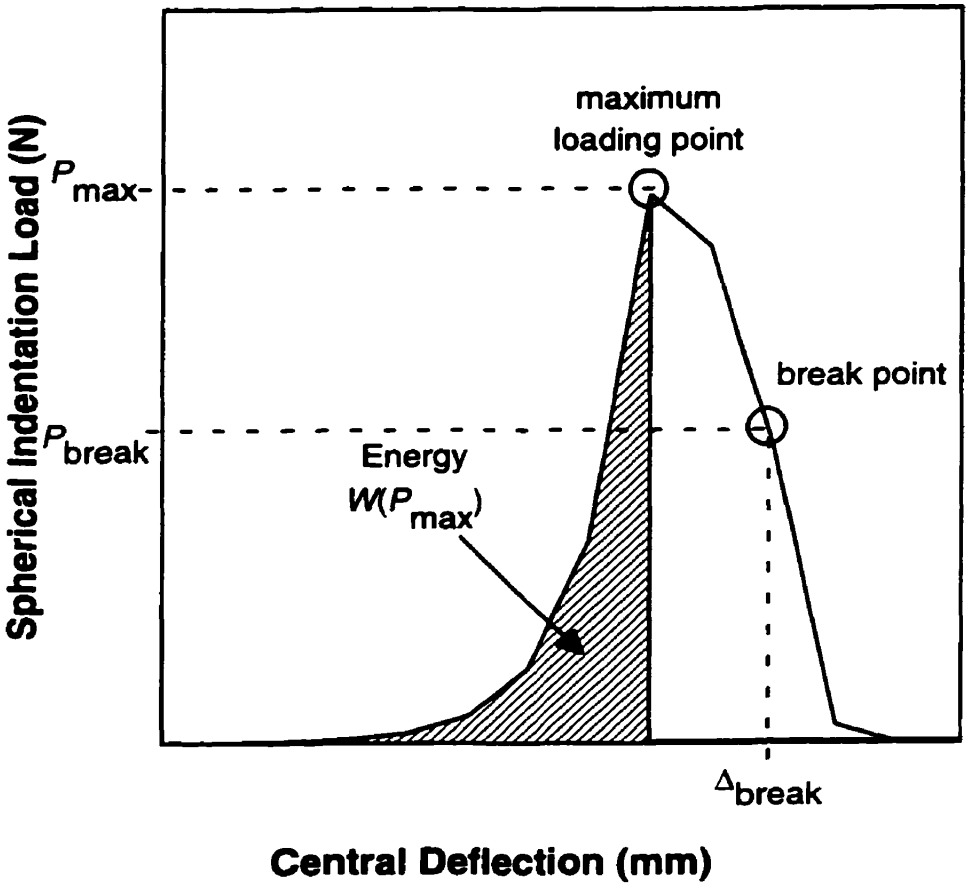


Figure 5.2: Schematic description of biomechanical properties for cutaneous equivalents. P_{max} = maximum load; P_{break} = load at break point; Δ_{max} = deflection at maximum load; Δ_{break}= deflection at break point; $W(P_{max})$ = maximum energy.

5.3.5 Statistical Analysis

The results are expressed as means ±standard deviation for each group. After obtaining a statistically significant F test from the *ANOVA*, a *Neuman-Keuls* test was accomplished to establish mean's comparison between groups. Differences were significant when p value was less than 0.05.

5.3.6 Histology

In order to carry out histological analysis, one specimen of each group (C, DE, SE) was not tested but fixed with Bouin's solution. Square biopsies of 5 mm^2 were made along the radius axis and they were embedded in paraffin. Then, several transverse sections (4.0 ±0.5 µm thick) were cut and stained with hematoxylin, phloxine and saffron. Evaluation of the thickness was done under light microscopy. To examine the resulting structure after stretching, we have also prepared with the same protocole both bSE_i and $hSE+_i$ which have been indented to 75% of their respective P_{max}.

5.4 Results

5.4.1 Biomechanical properties

The sampling of each group was limited by the time allowed for the accomplishment of all mechanical testing in one day. Then, at least three samples per group were tested and we duplicated tests on cutaneous tissues produced with bovine collagen on another day. All cultured cutaneous tissues except bDE ruptured at the outer diameter of contact (figure 5.1), approximately indenter's diameter. bDE were all rejected before testing because of premature failure. Accordingly, they were substituted by others dermal equivalents ($bDE^{=}$) which had underwent from day-4, less frequent medium changes using an every three days frequency.

The P-Δ curves for Cs, DEs, bSE_{al} and $hSE+_{al}$ may be approximated by power laws or exponential equations up to the maximum loading point. In the bSE_i and $hSE+_i$ curves, an identical path was observed halfway through the curves. This path can be explained by an apparent rupture of the dermal layer of the SE_i. From $\Delta = 0$ to 2-6 mm, curves showed a toe region characterized by a weak stiffness: there was no significative P response. The break point of each specimen corresponded almost to the maximum load point of the curve.

Table 5.3: The tensile properties of six groups of cultured cutaneous tissues: two dermal equivalents ($bDE^{=}$, hDE+), two living skin equivalents cultured in immersion (bSE_i, $hSE+_i$) and two living skin equivalents cultured at the air-liquid interface (bSE_{al}, $hSE+_{al}$).

	bC	**$bDE^{=}$**	**bSE_i**	**bSE_{al}**
n	6	9	5	5
P_{max}	0.128 ±0.034	0.104 ±0.012	0.364 ±0.048	0.312 ±0.098
(N)	(❑ ● ■)	(○ ● ■)	(◊ ▲)	(Δ ▲)
Δ_{max}	9.372 ±0.172	7.544 ±0.195	17.908 ±0.498	11.389 ±3.223
(mm)	(● ■)	(● ■)	(▲ ◆)	
$W(P_{max})$	0.215 ±0.073	0.143 ±0.020	2.583 ±0.342	0.985 ±0.505
(N•mm)	(❑ ● ■)	(○ ● ■)	(▲)	(■)
P_{break}	0.118 ±0.032	0.103 ±0.012	0.362 ±0.047	0.268 ±0.082
(N)	(❑ ● ■)	(○ ● ■)	(▲)	
Δ_{break}	9.538 ±0.197	7.577 ±0.210	17.968 ±0.527	11.749 ±2.871
(mm)	(● ■)	(● ■)	(▲ ◆)	
	hC+	**hDE+**	**$hSE+_i$**	**$hSE+_{al}$**
n	3	3	3	3
P_{max}	0.137 ±0.018	0.061 ±0.005	0.416 ±0.043	1.020 ±0.149
(N)	(○ ❑ ■)	(○ ❑ ●)	(Δ ◊)	
Δ_{max}	7.456 ±0.930	8.490 ±0.300	17.555 ±1.483	16.056 ±1.285
(mm)	(○ ❑ ■)	(○ ❑ ●)	(Δ ◆)	(Δ ▲)
$W(P_{max})$	0.305 ±0.130	0.128 ±0.006	2.890 ±0.497	5.091 ±1.341
(N•mm)	(○ ❑ ■)	(○ ❑ ◊ ●)	(Δ)	
P_{break}	0.114 ±0.025	0.049 ±0.005	0.416 ±0.043	1.020 ±0.149
(N)	(○ ❑ ■)	(○ ❑ ●)	(Δ)	
Δ_{break}	8.122 ±0.903	8.856 ±0.320	17.555 ±1.483	16.056 ±1.285
(mm)	(○ ❑ ■)	(○ ❑ ●)	(Δ ◆)	

Mean ±S.D. are given. Differences are significant when $p < 0.05$. Parentheses indicate non-significance: against bC (○); against $bDE^{=}$ (❑); against bSE_i (Δ); against bSE_{al} (◊); against hC+ (●); against hDE+ (■); against $hSE+_i$ (▲); against $hSE+_{al}$ (◆).

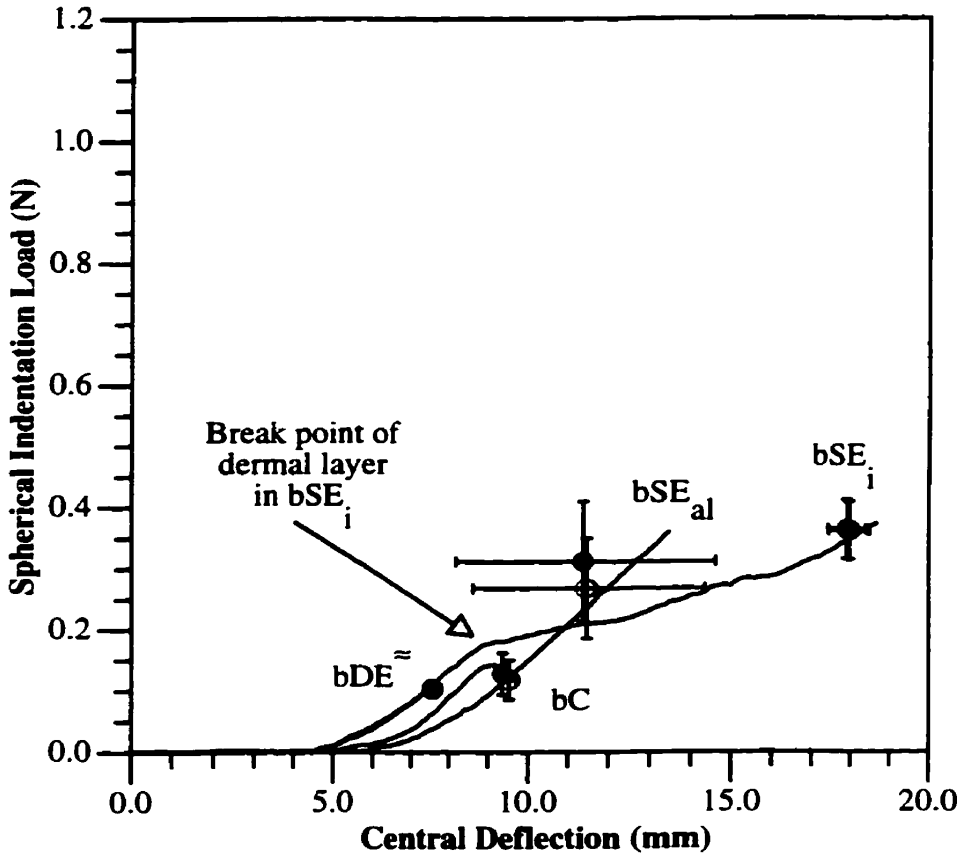


Figure 5.3: Typical curves of the spherical indentation load-central deflection relationship for cutaneous equivalents produced with bovine collagen and cultured 21 days. bDE = dermal equivalent, bSE_i = skin equivalent cultured in immersion, bSE_{al} = skin equivalent cultured at the air-liquid interface (9 days), and bC = collagen gel (control). The bars indicate standards errors of the mean for the points of maximum sperical indentation load (●) and breaking (○). Notes: *i.* bDE were already ruptured at the testing day; *ii.* The "≈" superscript indicates that specimens had underwent less medium changes than other specimens from day 4 onward.

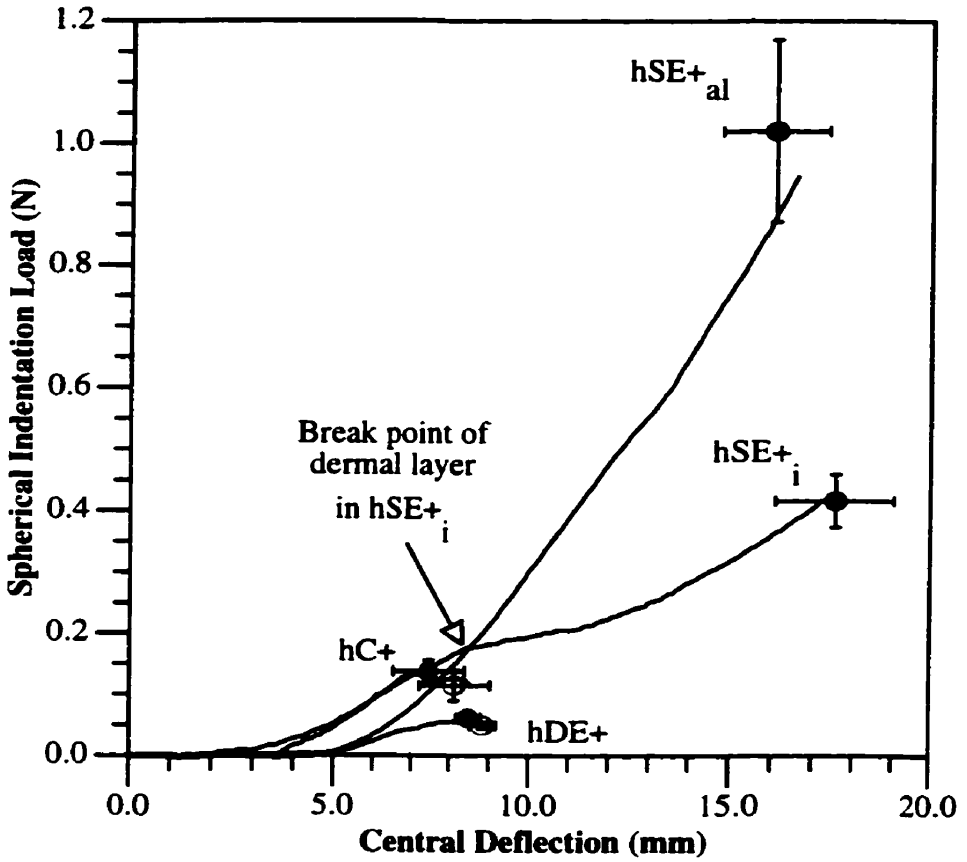


Figure 5.4: Typical curves of the spherical indentation load-central deflection relationship for cutaneous equivalents produced with human collagens and cultured 23 days. hDE+ = dermal equivalent, $hSE+_i$ = skin equivalent cultured in immersion, $hSE+_{al}$ = skin equivalent cultured at the air-liquid interface (9 days), and hC+ = collagen gel (control). The bars indicate standards errors of the mean for the points of maximum sperical indentation load (●) and breaking (○).

5.4.2 Maximum load and deflection at break points

The P_{max} of SEs were increased by 143% (bSE_{al}), 184% (bSE_i), 204% ($hSE+_i$) and 645% ($hSE+_{al}$) compared to their respective Cs, meanwhile we cannot confirm that P_{max} of DEs were slightly reduced. Increase of P_{max} had been quite remarkable with $hSE+_{al}$, 3.26 times P_{max} of bSE_{al}. Despite these performances, the P_{max} of $hSE+_{al}$ remained a weak mechanical value considering that 1.020 N in tension can be easily obtained under *in vivo* conditions. We established that there was a significative difference between cultured skin samples produced with human collagens compared to bovine collagens only when they were cultured at the air-liquid interface.

The Δ_{break}, so-called extensibility, of SEs was also increased by 23% (bSE_{al}), 88% (bSE_i), 98% ($hSE+_{al}$) and 116% ($hSE+_i$) compared to their respective C. Furthermore, we noted that fibroblasts seeded in the bCs reduced the extensibility of the matrix by 21% (see bDE). Here we reported the same results as for the tensile strength characteristics: comparison between each bovine and human cultured cutaneous tissues was not significative for Cs, DEs and SE_i. For the particular case of SE_{al}, we noted a significant increase (37% for $hSE+_{al}$) for Δ_{break}.

5.4.3 Energy needed for maximum load

$W(P_{max})$ calculations of SEs were all significantly higher than those of Cs and DEs. However, $W(P_{max})$ increases did not follow the same tendency as P_{max} parameter. Indeed, $W(P_{max})$ was increased by 358% (bSE_{al}), 847% ($hSE+_i$), 1101% (bSE_i) and 1569% ($hSE+_{al}$) compared to their respective Cs. An important difference was obtained between $W(P_{max})$ values of both air-liquid culture groups ($hSE+_{al}$ and bSE_{al}) while $W(P_{max})$ values of immersed culture groups ($hSE+_i$ and bSE_i) were almost equal.

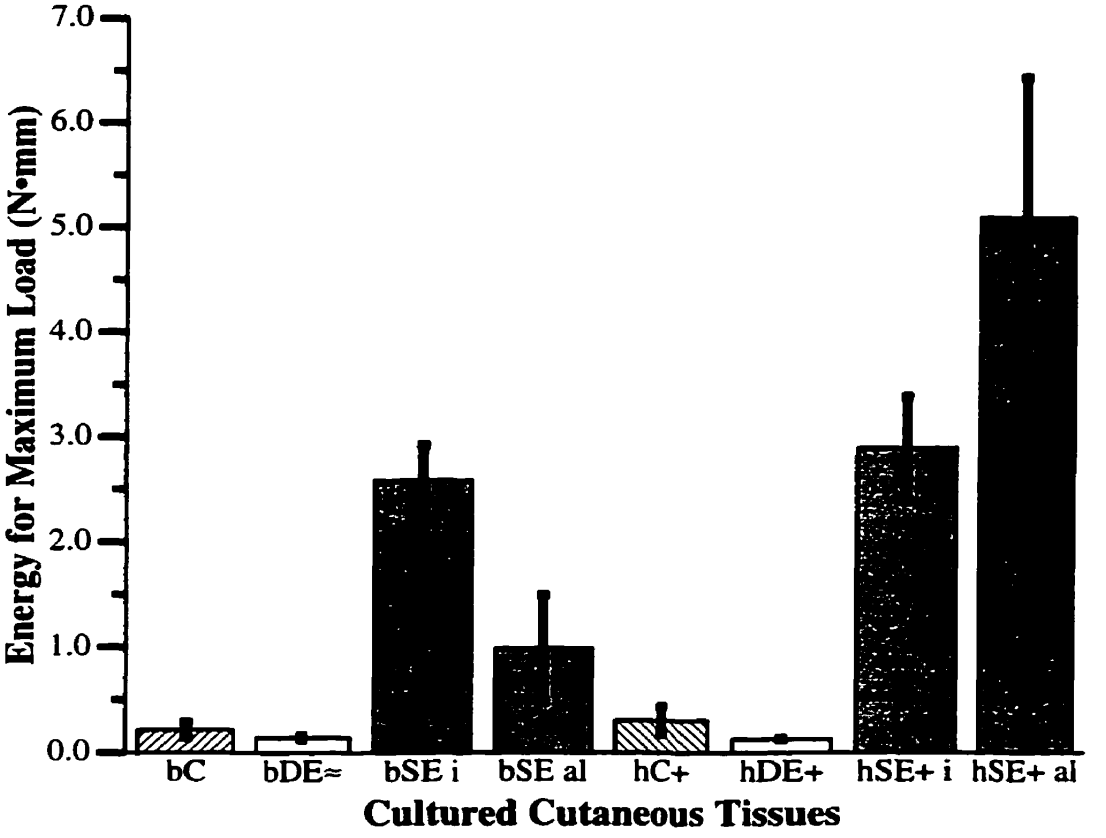
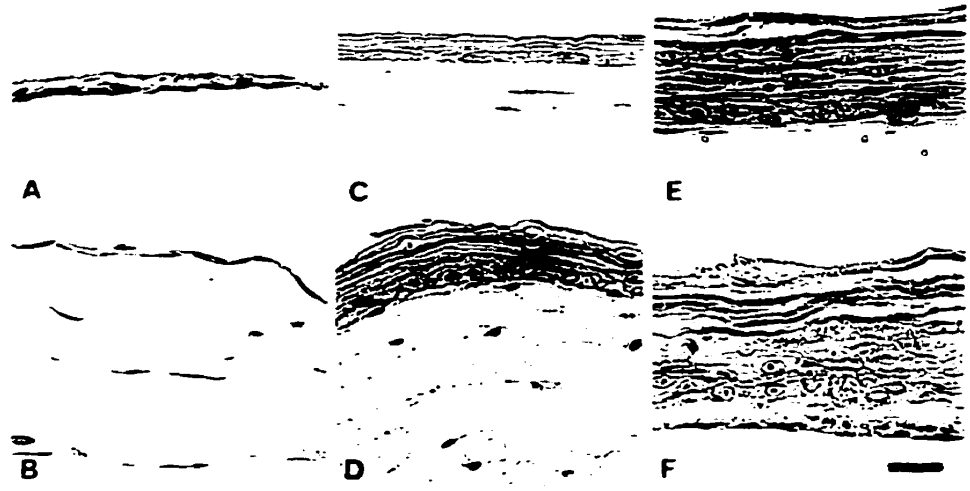


Figure 5.5: The figure shows the energy needed to reach the point of maximum load during a spherical indentation test as a function of cultured cutaneous tissues. Note: The "≈" superscript indicates that specimens had underwent less medium changes than other specimens from day 4 onward.

5.4.4 Histological analysis

We have observed that there was no significative variation in the thickness and structure in relationship to the radial coordinate of biopsies. Moreover, there is an intra specimen variation of the resulting dermal thickness. For example, the respective thickness measurements of bDE and hDE were ranging respectively between 5-15 µm and 100-130 µm, after 12 days under immersed culture conditions. In the analysis of SE_{al}, this randomized variation of dermal thickness was marked by a severe reduction down to 3 µm for bSE_{al} (see photography 5.1E) or in some localized areas, by total disappearance

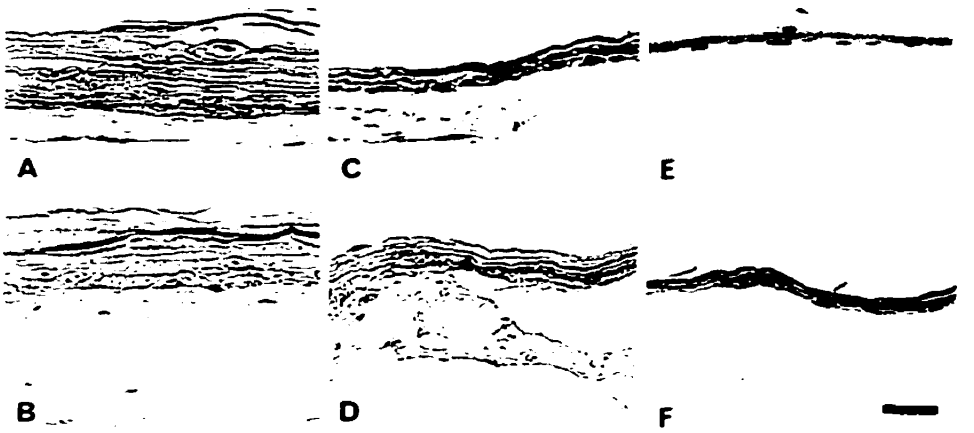
of dermal layer after 9 days at the air-liquid interface (total of 21 days in culture). The dermal layer of hSE_{al} was always thicker (30 µm, photography 5.1F).



Photography 5.1: Hematoxylin phloxine and saffron staining (dark) showing histological views of full thickness of cutaneous cultured tissues. Dermal equivalents: *A* = bDE, and *B* = hDE+; Skin equivalent cultured in immersion: *C* = bSE_i, and *D* = $hSE+_i$; and Skin equivalent cultured at the air-liquid interface for 9 days: *E* = bSE_{al}, and *F* = $hSE+_{al}$. Bars: *A* to *F*, 30 µm. Notes: *i.* The thickness of bDE and hDE+ by comparison respectively with bC and hC, were 40- and 6-fold lower; *ii.* On the day of mechanical testing, keratinocytes seeded on bDE and hDE+ (day-4) formed a thick multilayered epidermis in bSE_i and $hSE+_{al}$.

The differentiation level of an epidermal cell layer under submerged conditions was reduced and the contraction in thickness of dermal layer was slower (see photography 5.1C-D). On the other hand, the stratification and differentiation of epidermal cell layer were less developed in SE_i than they were in the SE_{al}. After 21 days in culture, the dermal component of bSE_{al} had become very thin but the epidermal layers were well stratified. In photography 5.1F, we illustrated a well stratified epidermal cell layer in $hSE+_{al}$. Furthermore, the *stratum corneum* was thicker and keratinocytes at the dermo-epidermal junction were cuboidal.

The investigation of hSE+$_i$ biopsies fixed after mechanical testing showed a complete dissociation of the epidermal cell layer from the dermal layer (photography 5.2). Analysis of cross-sectional view showed qualitatively the level of stretch with radial position. Hence, we confirmed that the failure position for the DE was located in the median zone corresponding almost to the outer diameter of contact (see photography 5.2C-D). We also showed that there was a separation between both epidermal and dermal layers in median zone of hSE+$_i$. In the central zone, the remaining structure was thinner and built of few sheets of elongated keratinocytes and *stratum corneum.*



Photography 5.2: Hematoxylin phloxine and saffron staining (dark) showing histological views of full thickness of living skin equivalents cultured in immersion (bSE$_i$: *A*, *C*, *E*; hSE+$_i$: *B*, *D*, *F*) and stretched up to 75% of respective P_{max}. Radial position of views, *A* and *B*= peripheral zone, *C* and *D*= median zone, and *E* and *F*= central zone. Bars: *A* to *F*, 30 µm. Notes: *i.* the dermal rupture in the median zone; *ii.* DE and the remaining structure was composed of elongated keratinocytes and *stratum corneum* .

5.5 Discussion

The purpose of this study was to determine the tensile properties of disk-shaped SEs which are to be used as clinical therapy for wound coverage and also valuable *in vitro* tools for skin modelling. First we established that SEs were composed of contractile dermal fibroblasts and, proliferating and differentiating keratinocytes. All these cells were involved in a cutaneous reconstruction which occured *in vitro* without any electrical or mechanical stimulations. This cutaneous structuring involves morphological changes such as the geometry of cells and the thickness of cutaneous layers.

In the dermal layer, fibroblasts reorganize the collagenous network using their attachments to the molecules and contractile mechanisms (Barocas and Tranquillo, 1994; Grinnell, 1994). As discussed in our previous experiments and by others (Bell *et al.*, 1991; López Valle *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1993; Grinnell, 1994; Germain and Auger, 1995), the peripheral anchorage of DEs, allowed us to control the dermal cell alignment and collagen orientation, leading to an *in vivo*-like dermal configuration. Despite this elegant method, some difficulties have appeared within bDE group when the reduction of dermal layer thickness initiated a failure a few days before the testing day. In this particular case, we assumed that the *mechanical stability* defined by Huang and co-workers (1993) as a definite state of interdependent parameters (i.e. crosslinking of collagen, mechanical strength and cell-collagen adhesion) which may approach physiologic wound remodeling, was conducted to an inappropriate state. On the other hand, we demonstrated that it was possible to avoid mechanical weakening of bDE if we decreased the concentration of chemical factors included in serum supplied by medium changes. However, any hypothesis concerned by how tractional remodeling is affected by growth factors, are highly speculative.

We also established that the use of hC+ which was denser than bC, helped to preserve the integrity of the dermal layer during the study period. It was demonstrated in our experiments that the compaction of hDE+ appeared less severe than bDE, either without (DE) or with (SE_i, SE_{al}) epidermal cell layers. The glycosaminoglycans in hC+ contribute to regulate and to stabilize the organization of collagen fibrils (Chapuis and Agache, 1992). Indeed, the structure of hC+ possibly allowed to withstand the contractile force of fibroblasts. Furthermore, the reacting force can be transduced in a different event by comparison with cells in bDE. Nevertheless, we noted that the mechanical performance of hDE+ such as strength and extensibility, was not really enhanced in comparison with the bDE.

Our results demonstrate that tensile strength of the SEs was significatively related to the epidermal cell layers rather than DEs. In the cultured dermal equivalent, the compaction involves firstly a rearrangement of existing collagen fibrils rather than their degradation and synthesis (Barocas and Tranquillo, 1994). This sequence of events does not diminish the role of DEs for the development of tensile properties in SEs, since these fibroblasts directly contribute to the dynamic equilibrium of the epithelium. On the basis

of $W(P_{max})$ calculations which integrated the coordinates of the maximum load point charactarized by strength and extensibility, the $hSE+_{al}$ have revealed the highest tensile performance because of the development of a more stratified *stratum corneum*. All cultured cutaneous tissues showed weak P_{max} values but we emphasize that they can get large extensibility, as expressed in term of a Δ-radius ratio, it went up to 1.41. In our P-Δ curves, there is a toe region characterized by a zero P response, that did not really represent a property of the tissue but a state of fibrillar alignment and mobility. The mechanical properties of these SE must be enhanced in order to approach physiological parameters. The P-Δ relationship proceeded from the tension of both radial and circumferential axis, and it was an alternative to further calculations of the load-elongation distribution in the cultured tissue. Significant reproductibility of the tests have been ensured by appropriate cares during preparations such as ponctuality of medium changes and efficiency of mechanical testing. Tests were also accomplished within a controled environment (pH and temperature) and on a marble table which isolated specimen from external vibrations.

Nowadays, fibroblast-populated collagen lattices or living dermal equivalents are used for different soft tissue reconstructions (Huang *et al.*, 1993; ; L'Heureux *et al.*, 1993), and few mechanical studies about these equivalents have been realized. Some studies reported uniaxial tensile properties of fibroblast-populated collagen lattices (Chapuis and Agache, 1992; Huang *et al.*, 1993) and other investigators (Delvoye *et al.*, 1991; Barocas and Tranquillo,1994; Grinnell, 1994) presented contractile force induced by fibroblasts. Such tests tell us little about the tensile properties of disk-shaped SEs submitted to physiological-like biaxial loading mode. We assume that the axisymmetry of the plane geometry is the more appropriate to obtain homogenous morphogenesis of skin and it is also communly use in cutaneous tissue culture. The disk-shaped geometry was defined as a membrane in a mechanical sense. We emphasize the presence of non-linearity in the P-Δ curves of cultured cutaneous tissue as it was found in load-elongation of fibroblast-populated collagen lattices (Huang *et al.*, 1993) and *stratum corneum* (Koutroupi and Barbenel, 1990).

Finally, this study was conducted in order to establish pre-sets in cyclic loading modes (unpublished data) which can greatly help to define the viscoelastic behavior of SE at high level of stretch. The importance of the presented quality control is obvious since the

biofunctionality of cutaneous organ includes mechanical properties as well as biomolecular mechanisms. A need exists to develop models that can reliably predict biaxial tensile properties when remodeling of cultured cutaneous tissues occurs. Further studies about geometric effects of indentation test and stress-strain distribution within equivalents are needed to transduce tensile properties presented in this work to universal engineering values.

5.6 Conclusions

The biaxial tensile properties of four SE models were studied using an indentation test in axisymmetrical and wet conditions. The comparison between models were based on the strength, the extensibility and the energy needed to puncture the specimens. The following conclusions emerged from our work:

1) The SEs produced with human type I and III collagens, elastin and glycosaminoglycans, and cultured at an air-liquid interface, offered the highest tensile strength performance and required more energy to puncture up to the rupture point than other models.

2) The DEs, either bovine or human, did not significatively contribute to the tensile performances of these SE models, but it influenced the pattern of keratinocyte differentiation which was directly responsible of the mechanical performance of SE (e.g. $hSE+_{al}$ as mentioned above in #1).

3) After three weeks in cultures, it was not clear whether the compaction induced by fibroblasts in DEs could modify the tensile properties of collagen gels.

4) Considering the weak resistance of cultured tissues, the indentation method with appropriatly rigorous cutaneous preparations proved to be very efficient in this study.

Chapitre VI
Article numéro 3

Mechanical Properties of Human Skin Equivalents Submitted to Cyclic Tensile Forces

H. Lafrance[1,2], L'H. Yahia[1], L. Germain[2,3], F.A. Auger[2,3]

[1] Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux, Institut de Génie Biomédical
École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

[2] Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Québec, Canada, G1S 4L8

[3] Département de Chirurgie, Université Laval
Québec, Québec, Canada, G1K 7P4

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Rina Guignard for the preparations of the skin equivalents. We thank Drs. Michel Guillot and Francine Goulet for their scientific collaboration, and Imedex, Lyon, France for the kind supply of human collagens. We also thank Tony Gibbon for reviewing the manuscript. This work was supported by both NSERC and MRC of Canada, the "Fondation des pompiers du Québec pour les Grands Brûlés", the "Fondation de l'Hôpital du St-Sacrement", and the "Réseau des Grands Brûlés du Fonds de la Recherche en Santé du Québec". L.G. and F.A.A. were recipients of scholarships from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec".

Journal: Skin Research and Technology

Date de soumission: septembre 1997

Sommaire: Cet article présente l'évaluation du comportement en tension d'équivalents cutanés humains ancrés cultivés *in vitro* en fonction de distensions répétées et en fonction d'une distension maintenue constante avec le temps. Les évalutations sont menées à l'aide d'une méthode de perforation développée au chapitre IV et à l'aide des mesures de résistance mécanique présentées au chapitre V. Des évaluations du derme équivalent et du gel de collagène humains sont également produites. Les évaluations sont réalisées à l'aide de propriétés mécaniques fonctionnelles décrivant l'élasticité, la viscosité et l'endommagement des équivalents cutanés.

CHAPITRE VI

MECHANICAL PROPERTIES OF HUMAN SKIN EQUIVALENTS SUBMITTED TO CYCLIC TENSILE FORCES

6.1 Abstract

Background/aims: As human skin equivalents (SE) represent an important breakthrough for clinical grafts and experimental *in vitro* study models, the various methods for mechanical and functional analyses are also gaining importance in the optimization process. SE characteristics have already been studied through indentation-strength and strain-energy methods. Since repeated tensile loading is a common reality of skin, we present in this paper the evolution of the indentation readings method for SE, including its dermal equivalent (DE) and collagen gel (CG), during cyclic tests.

Methods: Briefly, the *in vitro* production of the disk-shaped (25.4-mm-diameter) SE is based on the culture, under submerged conditions, of keratinocytes seeded on our anchorage-based DE, a human type I+III CG supplemented with elastin and GAGs. All specimens were submitted to quasi-static ramp-deflection cycles induced by means of an actuated hemispherical head (12.7-mm-diameter). We studied the effects of repeated loading through monitoring of the indentation load (P) versus the deflection (Δ) and the relaxation of P over 1000 s.

Results: With the help of the P—Δ indentation curves, we determined characteristics for typical CG, DE and SE. Following the respective loading history for each specimen, we demonstrated that the loading and unloading branches, the residual and the upper P, and the hysteresis shaped by the loading-unloading loop were consistent characteristics in the functional analysis of tissue engineered dermis and epidermis.

Conclusion: The P—Δ indentation curves obtained from a loading history give valuable characteristics which allow accurate description of the mechanical functions of tissue engineered skins during their optimization process for transplantation or experimental purposes.

Key Words: collagen gel; dermal equivalent; indentation; mechanical properties; skin equivalent.

6.2 Introduction

The mechanical functions of cutaneous grafts such as the novel tissue engineered skins is essential knowledge in the cutaneous reconstruction of severe burns (Helm, 1992; Dubertret and Coulomb, 1995; Germain and Auger, 1995) or in the treatment of ulcers for persons suffering from locomotor impairment (Margolis, 1995; Sanders *et al.*, 1995). Indeed, the newly developed skin equivalents (SE), while it remodels itself on the patient's body, will have to face, from day-one of grafting, several types of loading (i.e. mainly tension, friction and compression) due to points of contact with a surface and with internal tissues and organs (Matlhoko, 1994). The optimization of SE mechanical characteristics is an important challenge to avoid tissue scarring or breakdown after grafting. Functional analysis of SE is a new field of investigation in biomechanics because of the relatively recent SE applications (Langer and Vacanti, 1993; Nerem and Sambanis, 1995; Margolis and Lewis, 1995).

Originally, we developed a method to test the biaxial tensile properties of dermal equivalents (DE) (Lafrance *et al.*, 1995a), and we subsequently investigated the tensile strength of SE and the energy needed to rupture them (Lafrance *et al.*, 1995b). Throughout our previous experiments, we stated that the biomechanical testing of SE represents a strong potential in dermatological, cosmetic and physiological studies of skin. The uniqueness of SE in this field may be simply explained by the fact that we can engineer those tissues under certain conditions resulting in structures with reproducible functional properties (Michel *et al.*, 1993; Auger *et al.*, 1995; Lafrance *et al.*, 1995b; Michel *et al.*, 1995). Moreover, the monitoring of histological, biochemical and mechanical properties of SE is easier than with cutaneous biopsies. Another advantage of these SE is that destructive testing methods can be used.

In the accomplishment of its mechanical functions, the skin has to continually face many sequences of loading and unloading. The effect of these repeated sequences may lead to tissue breakdown or skin adaptation (Sanders *et al.*, 1995). On one hand, most of the researchers in rehabilitation centers have turned their attention to the *in vivo* loading tolerance of the skin breakdown by using animal models (Kosiak, 1959; Dinsdale, 1974; Nola and Vistnes, 1980; Daniel *et al.*, 1981) and many theories describing the etiology of the skin breakdown have been reported (Crenshaw and Vistnes, 1989; Ferguson-Pell *et*

al., 1997). For humans in sitting position, Yarkony has also reported that the skin tolerance to pressure increased over time (Yarkony, 1993). On the other hand, other researchers have demonstrated quantitatively some limited skin adaptations to mechanical stress, either static or dynamic, by using animal models (Lorber and Milobsky, 1968; Francis and Marks, 1977; Squier, 1980; Baker, 1991; Sanders *et al.*, 1993). In their review, Sanders *et al.* (1995) have illustrated skin adaptation by reporting many relationships between diameters and distributions of collagen fibrils, and the glycoasaminoglycans content versus loading history of tissues.

In this sense, SE submitted to numerous cyclic tensile forces will not remodel in the same manner as SE maintained in a purely relaxed state and these same forces may even rupture the tissue. A priori, the knowledge of SE mechanical behavior plays a fundamental role in cutaneous reconstruction. In this paper, we present some mechanical features of DE and SE prepared with elastin- and GAGs-supplemented human type I+III collagens. In this study, the "human" DE and SE were submitted to repeated indentations conducted under finite deformations. Up till now, the visual inspection of deformed SE suggested to us that it could support large deformations and that, simply put, it is apparently elastic. To better document this, the aim of this study is to detail with several objective characteristics the mechanical performance of SE submitted to cyclic tensile forces.

6.3 Materials and methods

6.3.1 Preparation of human cutaneous cell cultures

Employing the method of Rheinwald and Green (Rheinwald and Green, 1975) with the exception that the cell isolation technique where thermolysin is used prior to trypsin digestion for the complete separation of the epidermis from dermis (Germain *et al.*, 1993), the human dermal fibroblasts and keratinocytes were isolated from skin biopsies (i.e. reductive breast surgeries of healthy 38 and 18 year-old subjects). Cells were cultured according to the methods described previously (Auger *et al.*, 1995). Cells were used between their third and fourth passages. For the preparation of cell-populated DE, we set a suspension of fibroblasts to the concentration of 250 X 10^3 cells/ml of complete Dulbecco-Vogt modification of Eagles' medium (DMEM; Flow Lab., Mississauga, Ont., Canada) containing: 10% fetal calf *serum* (Gibco Labs), 100 IU/ml penicillin and 25

µg/ml gentamicin (Sigma). For the *epithelium*, we prepared a suspension of keratinocytes in a complete Dulbecco-Vogt modification of Eagles' medium with Ham's F12 (containing: 10% reconstituted newborn calf *serum* (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), epidermal growth factors (EGF) and other additives (complete DME Ham)) and 90 X 10^3 cells/cm^2 were seeded on each SE (Auger *et al.*, 1995).

6.3.2 Preparation of the disk-shaped dermal equivalents

The mixture of the "human" DE model was composed (in the order that follows) of a 7 ml-2.7X DMEM (containing: 40% fetal calf *serum* (Gibco Labs), 200 IU/ml penicillin and 50 µg/ml gentamicin (Sigma)), a 0.02 ml-4 N HCl, a 1.25 ml-fibroblast-suspension (see description above), a 10 ml-stock solution of human type I:III (63:37) collagens (Imedex, Lyon, France) at the concentration of 6.26 mg/ml of apirogen water (Tiollier *et al.*, 1990) , a 1.25 ml-solution of apirogen water containing hyaluronic acid from human umbelical cord at 0.062 mg/ml, chondroitin sulfate from porcine skin at 0.122 mg/ml and heparan sulfate from bovine kidney 0.002 mg/ml, and finally a 1.25 ml-solution of elastin extracted from bovine neck ligament at 1.336 mg/ml of 0.2M TRIS, pH 8.0. 2-ml-volume of DE mixture was poured into 35-mm-diameter Falcon® petri dishes (Becton Dickinson, Mississauga, Canada) containing two superposed unglued 25.4 mm-inside diameter rings of filter paper (Whatman, Maidstone, UK) which allowed the peripheral anchorage of the gels (López Valle *et al.*, 1992; Michel *et al.*, 1993). The DEs were kept at 37°C in 8% CO_2 and a 92% air atmosphere. The first medium change occured on day-2 with the same DMEM solution used for fibroblast cultures, until the addition of keratinocytes.

6.3.3 Preparation of skin equivalents

At day-4, a 0.4 ml-suspension of keratinocytes was layered onto DE as previously described (Auger *et al.*, 1995; Germain and Auger, 1995) to produce SE. All SE were kept immersed during the whole culture period. From day-4 to day-13, the medium was complete DME Ham. From day-14 to day-21, the SE were cultured with complete DME Ham medium without EGF. The culture medium was changed daily.

6.3.4 Biomechanical testing

For all the tests, we used the indentation method that we have previously described (Lafrance *et al.*, 1995b). Briefly, the mechanical testing system consisted of a universal material tester (Vitrodyne® V1000, John Chatillon & Sons Inc., NC, USA), a precision gram sensor (GS-150, Transducer Techniques, USA), a frictionless indenter with a hemispherical head (12.7-mm-diameter) and a circumferential grip for the disk-shaped specimens. The test equipment included a mobile structure with the V1000 actuator and the sensor in which the indenter was inserted using a rigid extension. This system allows the motion of the head along the axis perpendicular to the plane of the specimens. Once the head has been positioned at the bottom of the specimen's anchorage, its deflection (Δ in mm) was set to zero and three sequential tests interrupted by a 5 minute pause were conducted per specimen (see protocol illustrated in figure 6.1). The setting of the first test programmed for a preconditioning, was ten ramp-Δ cycles (p1:p10) accomplished between 5% and 75% of an averaged maximum Δ-value ($\overline{\Delta}_{max}$, established in previous

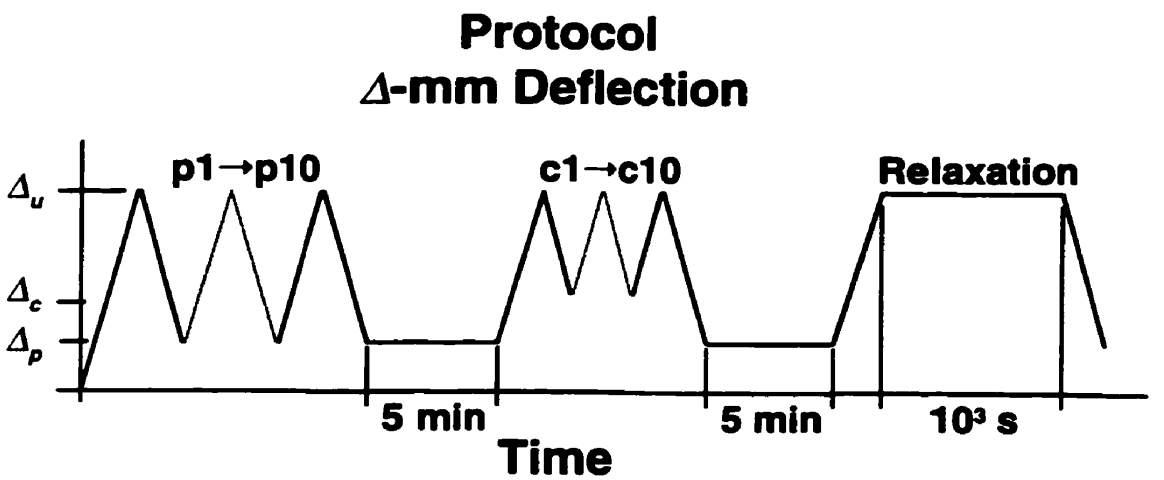


Figure 6.1: Sequence of ramp-Δ cycles (p1:p10; c1:c10 and Relaxation) for the experimental loading protocol. The companion Δ_p, Δ_c and Δ_u values are presented in Table 6.1.

investigations (Lafrance *et al.*, 1995b)), respectively described by Δ_p and Δ_u. (see table 6.1). The second test was also ten ramp-Δ cycles (c1:c10) but accomplished in a shorter Δ-stroke between 20% (prior to 5%) of $\overline{\Delta}_{max}$ (Δ_c) and Δ_u. Below Δ_c, the CG, DE and SE whithstood the head deflection showing negligible forces (Lafrance *et al.*, 1995b). The last test was a relaxation experiment programmed for 1000 s hold time at 75% of $\overline{\Delta}_{max}$. Under protocol, the ramp-Δ cycle was set to ±200 µm/s. For experiments to be effective, it was essential that all tissue engineered specimens be prepared from the same lot (with same chemicals, cells, manipulations, etc...) and not less than an hour was required per three-stage biomechanical test. Three specimens of CG, DE and SE were tested per day.

Table 6.1: Informations of the Δ-deflection stimuli used in the ramp-Δ cycles.

Specimens	$\overline{\Delta}_{max}$§ (mm)	Δ_p (mm)	Δ_c (mm)	Δ_u (mm)
CG	7.424	0.371	1.485	5.568
DE	8.490	0.425	1.698	6.368
SE	17.555	0.878	3.511	13.166

The Δ stimuli of each specimen were established from their averaged ultimate deflection§ ($\overline{\Delta}_{max}$). Lower Δ in first preconditioning test ($\Delta_p = 0.05 \cdot \overline{\Delta}_{max}$); Lower Δ in 2nd cycling test after a 5 minute pause ($\Delta_c = 0.20 \cdot \overline{\Delta}_{max}$); Upper Δ used for all cycles and relaxation test ($\Delta_u = 0.75 \cdot \overline{\Delta}_{max}$).
§ Average of ultimate deflection ($\overline{\Delta}_{max}$) corresponding to P_{max} readings in experiments described in Lafrance *et al.* (1995b).

The experiments were conducted under the conditions previously described (Lafrance *et al.*, 1995b): i.e. the specimens were submerged in a DMEM solution containing HEPES at 22°C and the pH was maintained to 7.2.

During each test, the relationship of the indentation load (P in mNewton) versus Δ was recorded (see figure 6.2). The mechanical characteristics presented in figure 6.2 refer to the residual and upper indentation loads per cycle (P_{res} and P_u), the calculated energies needed to load and unload for each indentation cycle (W_l and W_{ul} in mNewton•mm), and

the calculated hysteresis (H) which is the difference of W_l over W_{ul} for a closed loading-unloading loop (i.e. the same P_{res}). The errors in mechanical characteristics were estimated from the maximum absolute errors (Piskounov, 1980) derived from error values of 0.75 mN for P and 0.025 mm for Δ.

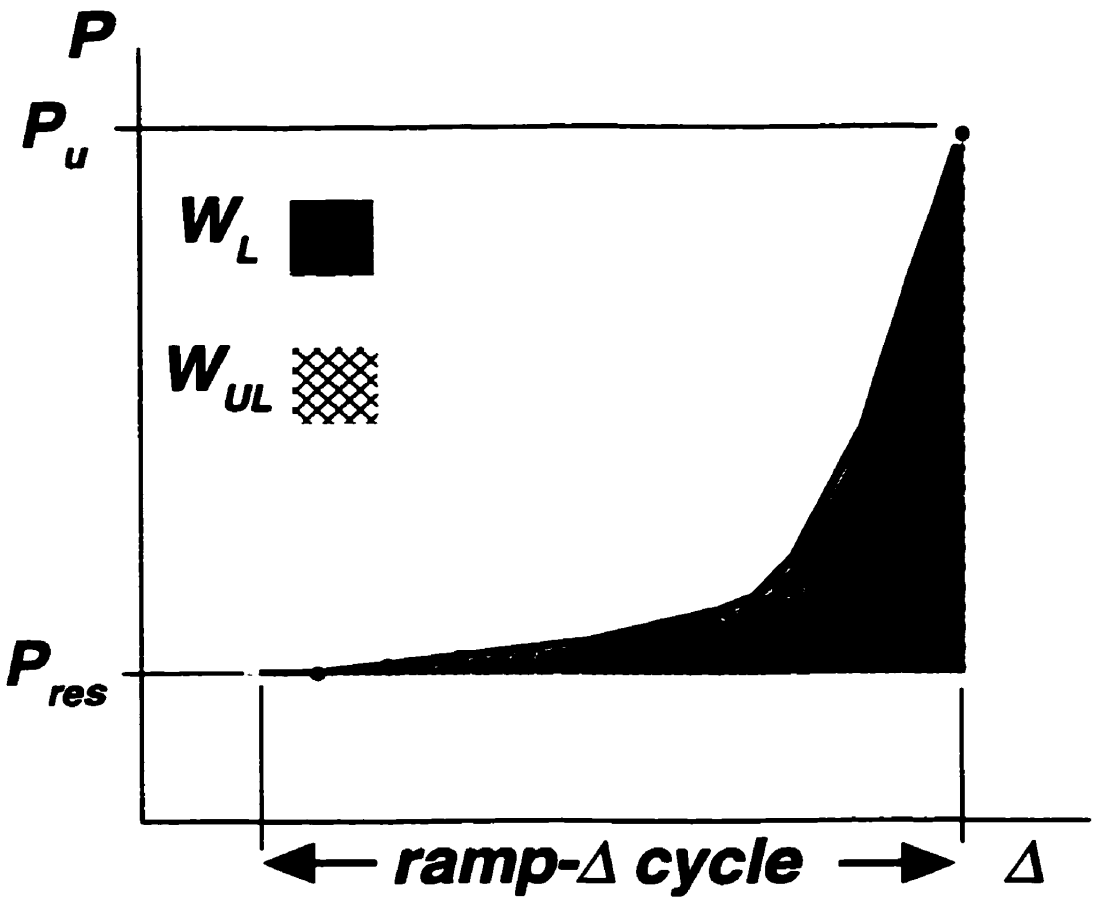


Figure 6.2: Schematic description of indentation readings: load (P) versus central deflection (Δ) on disk-shaped specimen submitted to a ramp-Δ cycle. Line patterns were added to distinguish branches: Loading (—); Unloading (— • —). Residual indentation load (P_{res}); Upper indentation load (P_u); Calculated loading energy (W_l); Calculated unloading energy (W_{ul}).

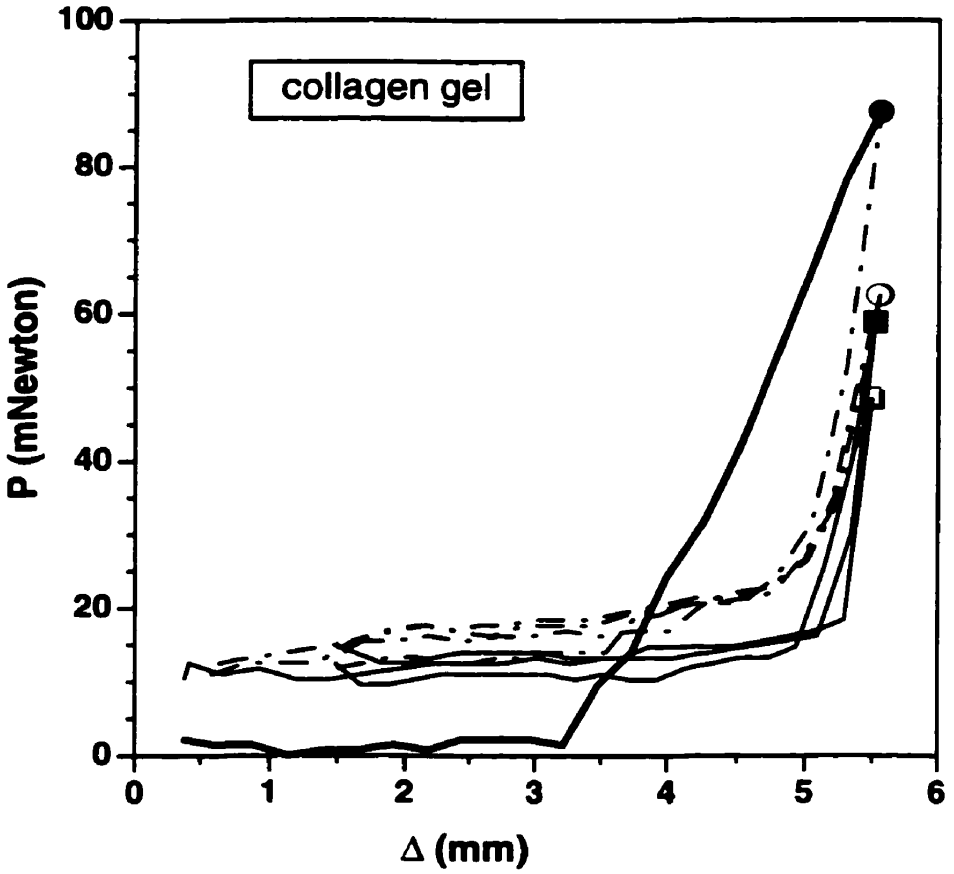
6.4 Results

6.4.1 Indentation load versus ramp—Δ cycles

Two different types of behavior may be identified from the typical P—Δ curves (both loading and unloading branches) of CG, DE and SE during p's cycles and c's cycles (figure 6.1 and 6.3), a toe-part (*Toe-P*) and a linear finishing-part (*LF-P*). One exception was found in p1 loading of SE (figure 6.3C) where we noted the appearance of a third part in the P—Δ curve. However, we confirmed as we already did previously (11), that the DE and *strata* underlying the *stratum corneum*-like structure (SC-like) have ruptured by the time the indenter reached the two thirds of Δ—stroke in p1 loading (figure 6.3C). This was done on purpose allowing us to evaluate the mechanical role of the resulting SC-like in cultured SE.

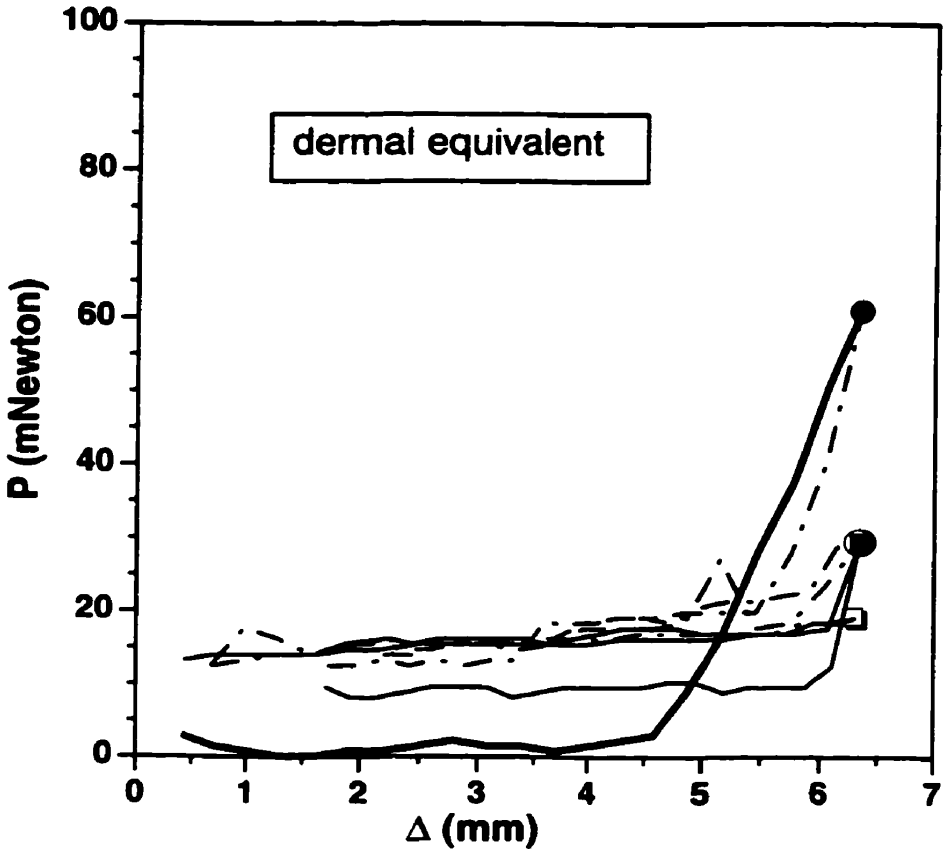
With the increasing number of cycles, the *LF-P* of all specimens shortened by comparison with the *Toe-P* (figure 6.3). We also observed that the *Toe-P* of the SC-like of SE was especially more pronounced than that of the corresponding DE, so much that the *LF-P* of the SC-like was out of step compared with the *LF-P* of the DE one (see figure 6.3C).

The slope of *LF-P* characterizing the "stiffness" of the engineered tissues is not equivalent to the normalized engineering Young's modulus. For exemple, Schober *et al.* (1994) had already demonstrated the probe-diameter dependence of this characteristic. In the loading branches, the *LF-P* of CG and DE became stiffer with an increasing number of cycles and conversely, the SC-like of SE reached a constant stiffness following p1 cycle. In the analysis of the unloading branches, the *LF-P* of all specimens showed a loss in stiffness with an increasing number of cycles. Moreover, we observed that the *LF-P* in loading branches of all specimens showed a relative gain in stiffness by comparison with their respective unloading branches.



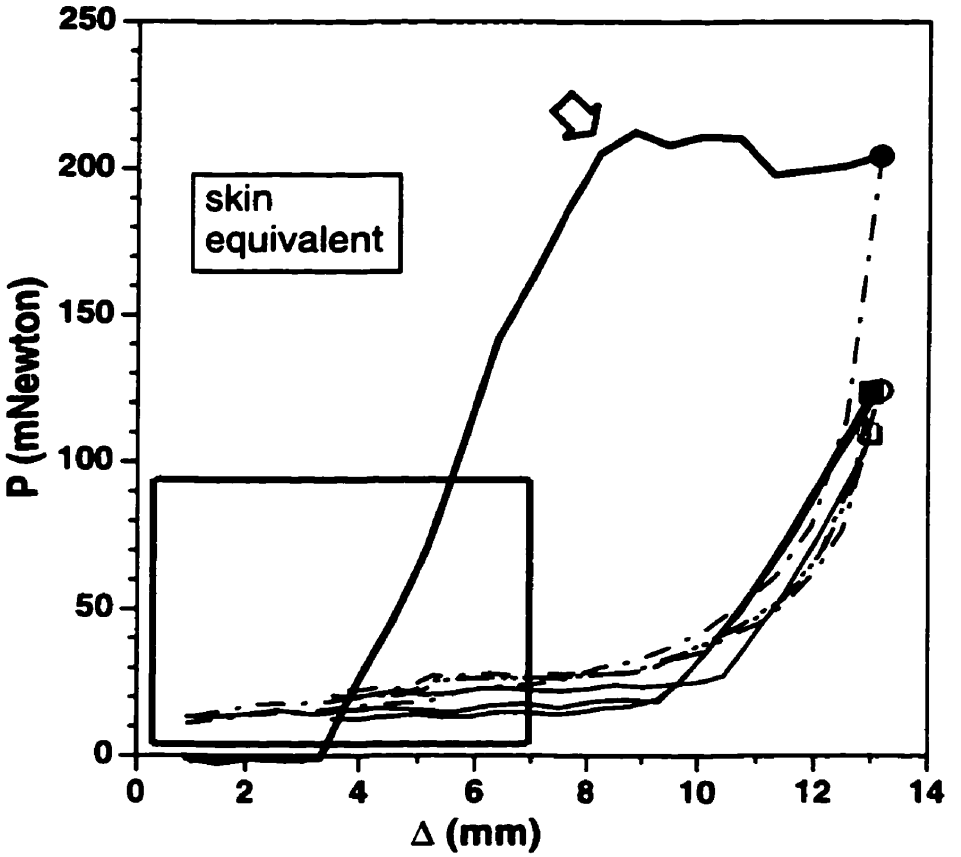
(A)

Figure 6.3: Typical curves of indentation load (*P*) readings during ramp-*Δ* cycle for (A) CG, (B) DE and (C) SE. Loading branch (—); Unloading branch (— · —). Symbols were added to distinguish cycles: ● (p1); ■ (p10); ○ (c1); ❑ (c10). Notes: The gray arrow denotes the rupture of the dermal equivalent and the epithelial *strata* underlying the *stratum corneum*-like structure. The gray window indicates the area covered by both CG and DE responses.



(B)

Figure 6.3: Typical curves of indentation load (*P*) readings during ramp-*Δ* cycle for (A) CG, (B) DE and (C) SE. Loading branch (—); Unloading branch (— · —). Symbols were added to distinguish cycles: ● (p1); ■ (p10); ○ (c1); ❑ (c10). Notes: The gray arrow denotes the rupture of the dermal equivalent and the epithelial *strata* underlying the *stratum corneum*-like structure. The gray window indicates the area covered by both CG and DE responses. (Suite)



(C)

Figure 6.3: Typical curves of indentation load (*P*) readings during ramp-*Δ* cycle for (A) CG, (B) DE and (C) SE. Loading branch (—); Unloading branch (— · —). Symbols were added to distinguish cycles: ● (p1); ■ (p10); ○ (c1); ❑ (c10). Notes: The gray arrow denotes the rupture of the dermal equivalent and the epithelial *strata* underlying the *stratum corneum*-like structure. The gray window indicates the area covered by both CG and DE responses. (Suite)

6.4.2 Energy losses and residual loading

Following the p1 cycle, the CG and SE specimens underwent an energy loss (table 6.2) higher than expected in a hysteresis loop since at the end of p1 cycle, P_{res} was higher than initial 0 mN-P value. This kind of plasticity may also be expressed by an average of P_{res} (figures 6.3 and 6.4) which was subsequently stabilized after the p1 cycle. For all cycles, no visual sign of plasticity was detected from submerged specimens except for the rupture of DE in SE which occured in the p1 cycle.

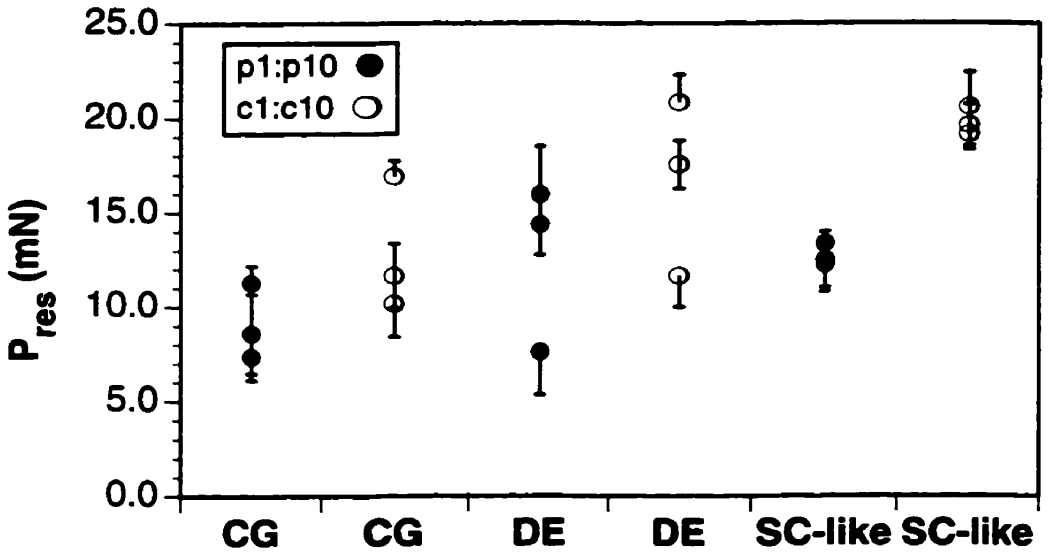


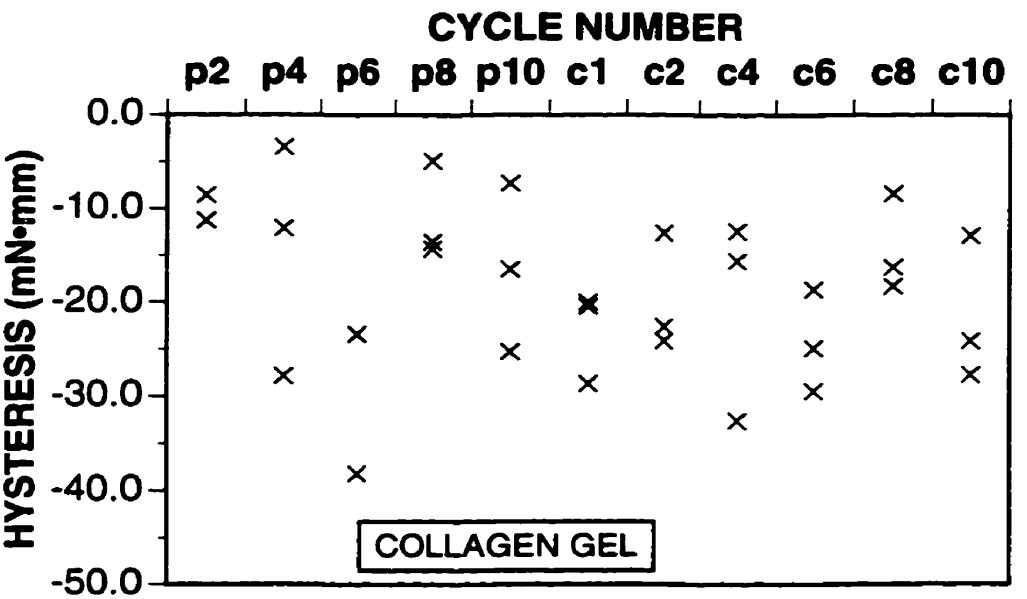
Figure 6.4: Scatterplot of residual indentation load (P_{res}) after ramp-Δ cycles for CG, DE and SC-like. Symbols were added to distinguish Averaged P_{res}: ● (during preconditioning); ○ (during cycles following preconditioning cycles after a 5 minute pause).

Table 6.2: Energy loss following the first preconditioning cycle ($W_{loss\text{-}p1}$) for CG, DE and SE.

$W_{loss\text{-}p1}$ (mN•mm)		
CG	**DE**	**SE**
67.0 ±16.1	1.3 ±16.0	1172.4 ±41.4
32.5 ±15.2	-1.8 ±16.1	1155.2 ±39.3
44.3 ±15.9	15.5 ±16.7	1204.8 ±38.1

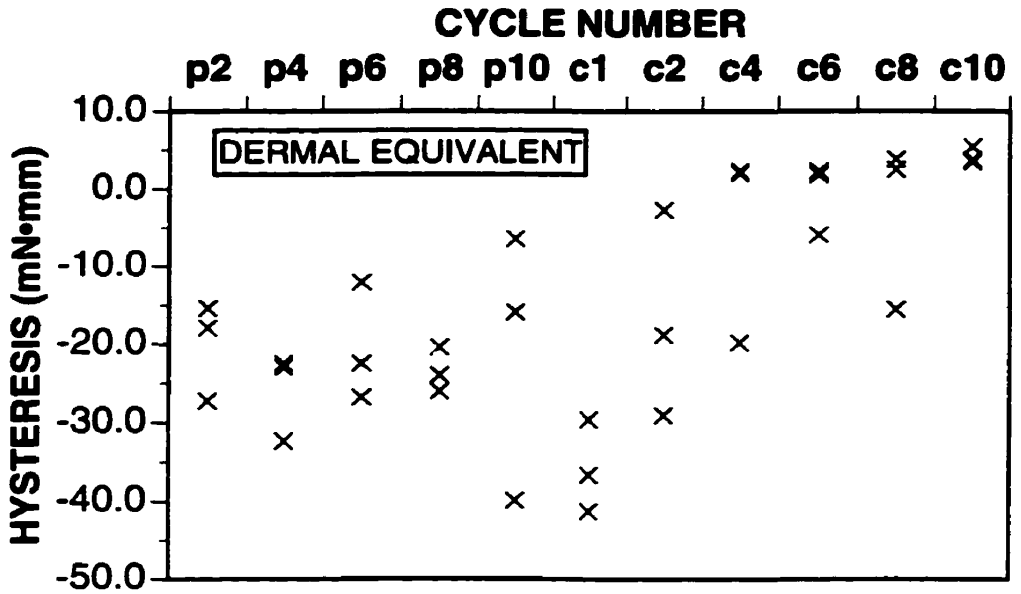
6.4.3 Hysteresis

Surprisingly, we calculated low negative H values for CG and DE (figure 6.5A-B). In one hand, no significant deviation of the calculated H values versus the number of cycles can be detected from CG. While, on the other hand, the H values of DE followed a low

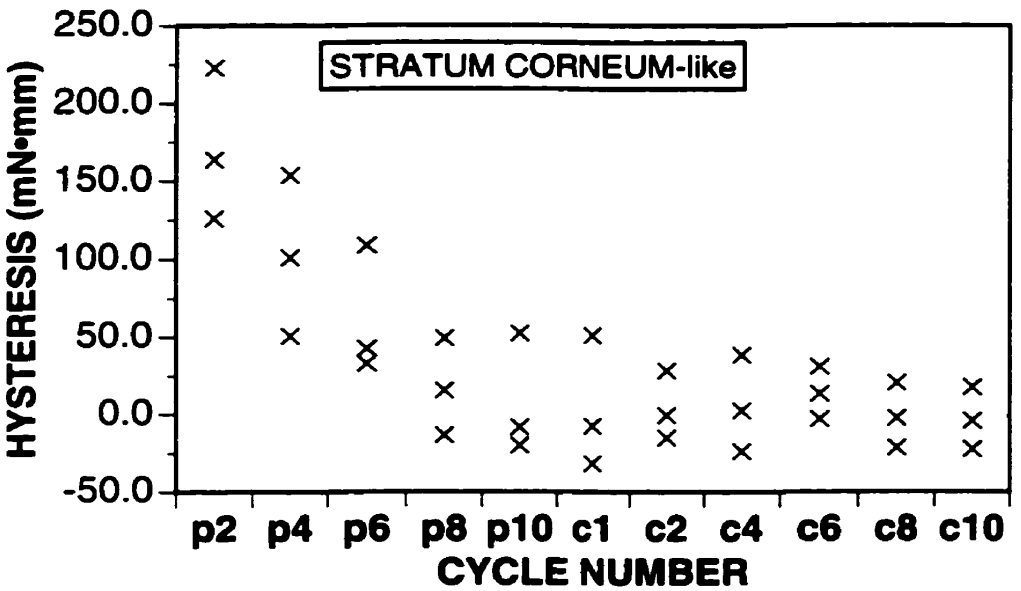


(A)

Figure 6.5: Scatterplot of hysteresis value (H) for each ramp-Δ cycle: (A) CG ($\pm\Delta H|_{max}$ = 10.883), (B) DE ($\pm\Delta H|_{max}$ = 10.616) and (C) SC-like ($\pm\Delta H|_{max}$ = 28.926) . Preconditioning cycles (p2:p10); Cycles following preconditioning cycles after a 5 minute pause (c1:c10).



(B)



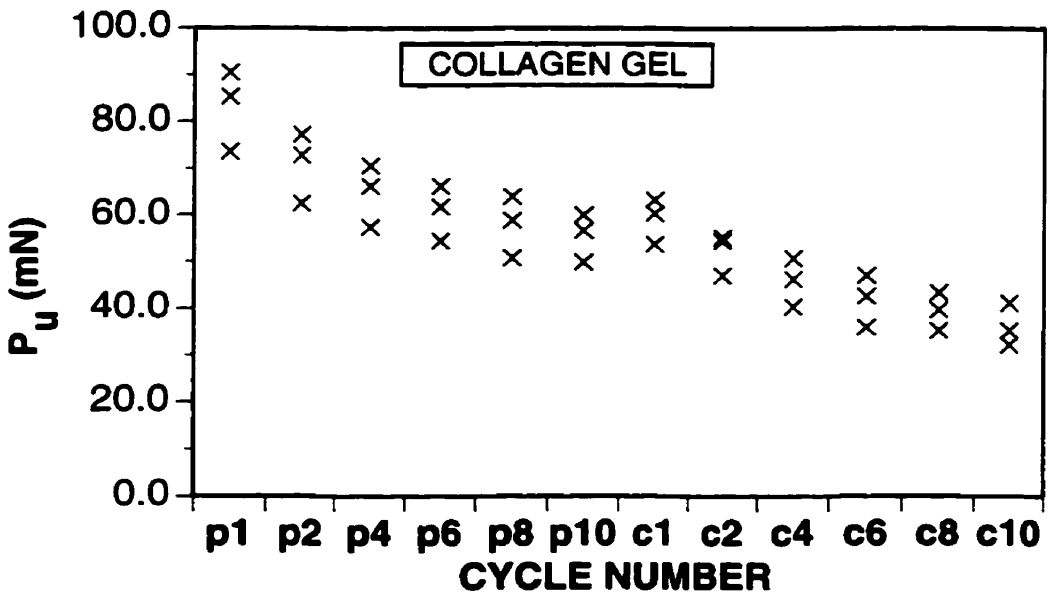
(C)

Figure 6.5: Scatterplot of hysteresis value (H) for each ramp-Δ cycle: (A) CG ($\pm\Delta H|_{max}$ = 10.883), (B) DE ($\pm\Delta H|_{max}$ = 10.616) and (C) SC-like ($\pm\Delta H|_{max}$ = 28.926) . Preconditioning cycles (p2:p10); Cycles following preconditioning cycles after a 5 minute pause (c1:c10). (Suite)

increase up to 0 mN•mm. In the SC-like case which followed the p1 cycle of SE, the analysis of H (figure 6.5C) presents a dissipation of energy and a downward trend stabilizing at 0 mN•mm.

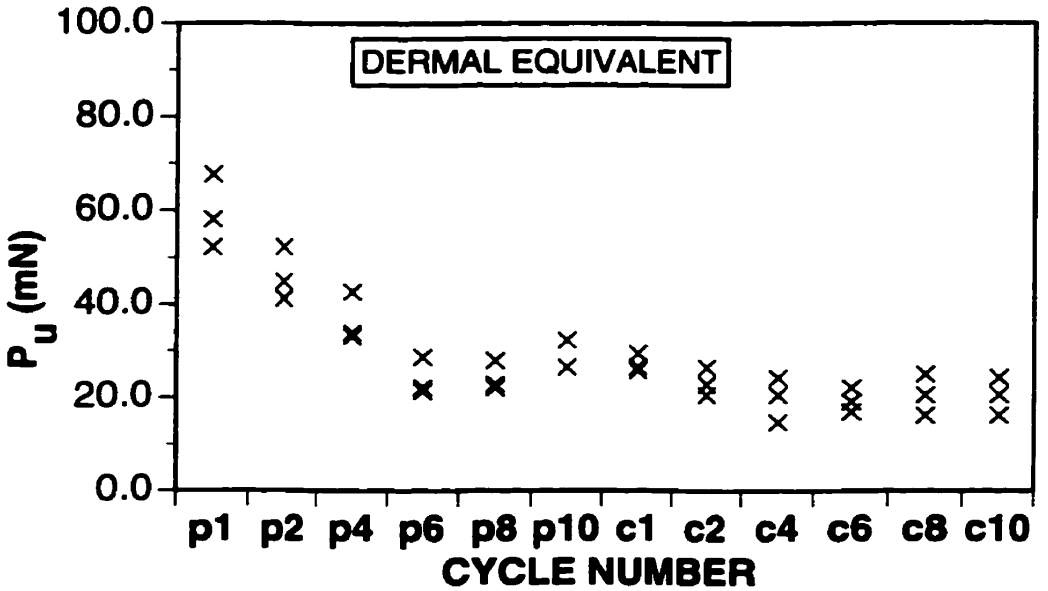
6.4.4 Relaxation

From one cycle to the next cycle (p1:c10), it was observed for every specimen that P_U (figure 6.6) decreased monotonically down to a lower rate. In the SC-like of SE, this kind of relaxation appears to be continued as demonstrated in relaxation curves over a 600 s period (see typical curves in figure 6.7) where the calculated ratio P/P_U decreased originally down to 0.85. At the half-way mark of the relaxation cycle, the curves of the SC-like underwent a sudden drop in P/P_U (up to 10% of P_U). In addition,we also observed a new whitish appearance of the CG and DE at the end of all tests.

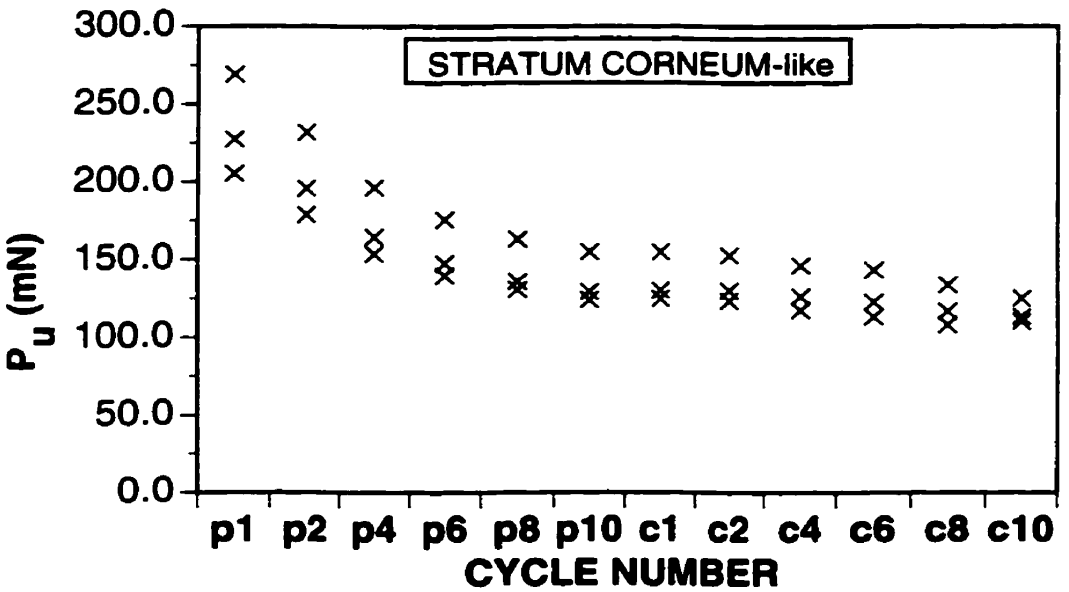


(A)

Figure 6.6: Scatterplot of upper indentation load (P_U) reached during each ramp-Δ cycle: (A) CG, (B) DE and (C) SC-like. Preconditioning cycles (p1:p10); Cycles following preconditioning cycles after a 5 minute pause (c1:c10).



(B)



(C)

Figure 6.6: Scatterplot of upper indentation load (P_U) reached during each ramp-Δ cycle: (A) CG, (B) DE and (C) SC-like. Preconditioning cycles (p1:p10); Cycles following preconditioning cycles after a 5 minute pause (c1:c10). (Suite)

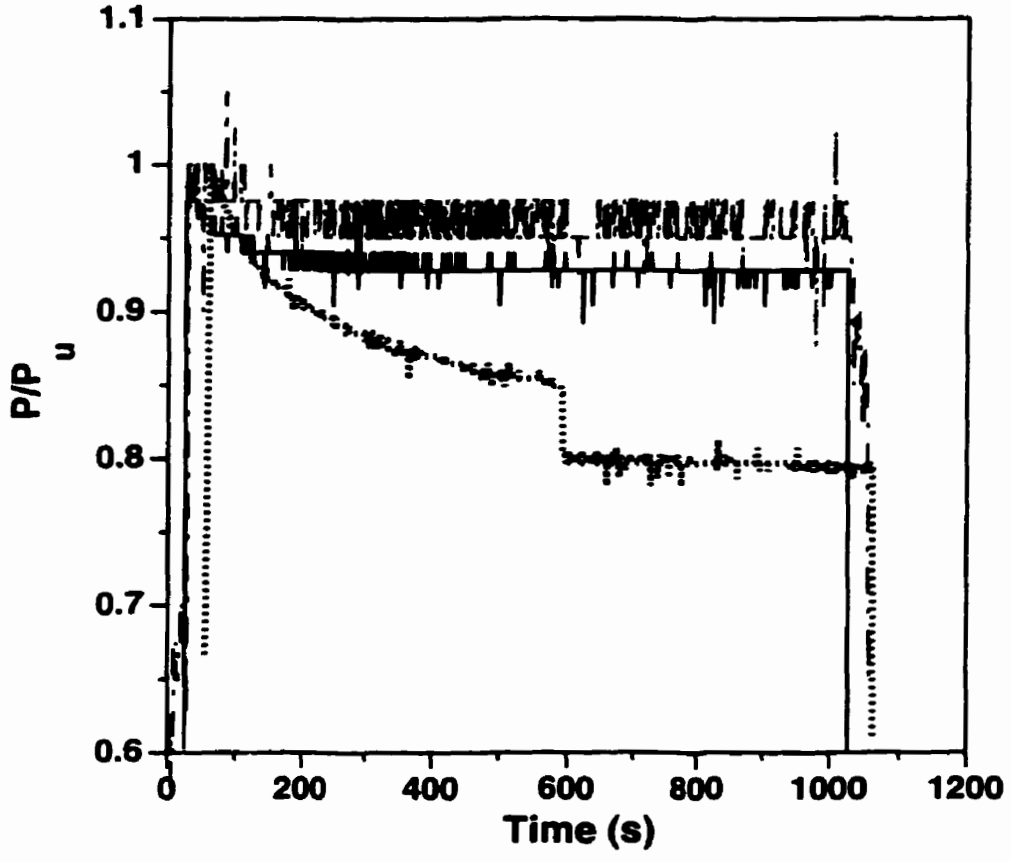


Figure 6.7: Typical relaxation curves for CG, DE and SC-like, following cycles after a 5 minute pause. Normalized indentation load ($P \bullet P_U^{-1}$) readings during a constant deflection (respectively 5.568, 6.367 and 13.166 mm-Δ for CG, DE and SE) over a 1000 s period. Line patterns were used to distinguish specimens: CG (—); DE (— - —); SC-like (• • •).

6.4.5 Short-duration pause effects

The 5 minute pauses (see protocol, figure 6.1) at low P loading did not contribute to major restoration of tissue equivalents. No significative differences beween indentation characteristics of p10 and c1 were detected (e.g. see figure 6.3).

6.5 Discussion

A typical required function of skin is to be able to withstand biaxial tensile forces. In this respect, the performance of optimized "human" SE has been studied by testing it, and as well, separately, its corresponding CG and DE. For each cultured "human" CG, DE and SE preparations, we measured the P—Δ relationship during a variety of loading histories. For these engineered tissues, the evolution in the P—Δ relationship with the number of cycles adds significant details to the a priori assumption of elasticity perceived with the "hand and eye" method. This evolution may be marked by many consistent characteristics: i) the ascending shift of the P—Δ curve (see P_{res}) occuring right after the p1 cycle, ii) the exponential decrease of the P_u with the number of cycles, and iii) the two distinct exponential curve's paths related to the loading and unloading branches. By comparison with a control skin biopsy (breast surgery) (unpublished data), we established that the latter (ii) and (iii) behaviors appeared very similar and conform to the characteristics of human skin.

For the energy-term calculations (W_l and W_{ul}), the difficulty lies in the fact that the errors become significant for low energy-term in spite of accurate P- and Δ-readings. Nevertheless, the analysis of energy-terms (e.g. H and $W_{loss\text{-}p1}$) led us to a firm conclusion that under quasi-static deformations, the CG, DE and SE dissipated a large quantity of energy during the first p1 cycle by comparison with other following cycles of the protocol. Not only was the energy dissipated from the p2 cycle less pronounced than from p1 but the assessment of the hysteresis in P—Δ curve of CG and DE demonstrats a low energy gain. This later assertion appears to us to be a specific feature of the GAGs-supplemented "human" CG since a negligible hysteresis was already observed in the same conditions for typical unsupplemented bovine CG (unpublished data).

To sum up, various physical mechanisms may be responsible for the evolution of the mechanical characteristics presented by "human" DE and SE submitted to loading history: e.g..the fluid flow within the highly hydrated tissue, the intrinsic viscoelasticity of fibrillar nework (either collagen or keratin), the changes in interconnectivities of the fibrillar network, or also the osmotic effects of fixed ionized charge groups (GAGs). Under equilibrium (i.e. quasi-static conditions), it is generally accepted that the fuid flow

relative to the collagen fibrils network is considered as a negligible mechanism in the dissipation of energy during loading (Lanir, 1996). In an equilibrium stage, the mechanical response consists of a combined contributions of the fibril's uniaxial elasticity and the fluid osmotic pressure.

Further, another suggested mechanism responsible for the instability of the mechanical performance under quasi-static conditions is the intra- and inter-molecular micro-damages or reconstructing interconnectivities in both collagen fibril and keratin filament networks. This possible mechanism has been modeled and termed *strain-softening* by Emery *et al.* (1997) on left ventricular myocardium. In a different modeling of this mechanism, Belkoff and Haut (1991) estimated a soluble collagen content in the uniaxial tensile response of rat skin. Recently, Parkinson and co-workers (1997) applied local rules for damage accumulation in computer generated collagen fibrils to demonstrate the micro-damage effects on tensile response of fibrils. For the strateum corneum, Rasseneur *et al.* (1982) have already discussed the intra- and interconnectivities of keratin filament when it was stretched under static and dynamic conditions.

However, it has not been possible in this study to elucidate quantitatively which of the above mechanisms has the most predominant effect during loading history. Our results suggest that the intra- and interconnectivities of fibrillar protein and the osmotic pressure of the highly hydrated "human" and GAGs-supplemented CG and DE are two mechanisms which appear to influence significantly the mechanical response under quasi-static conditions.

In conclusion, we studied the mechanical characteristics of new tissue engineered skins under quasi-static conditions during a loading history and we showed that the mechanical characteristics are measurable. Even though we noted that "human" SE may undergo many structural changes that we suspect but did not quantify exactly, we show that we can predict the characteristics of whole SE if we know the characteristics of the components. We beleive that the methodology developed in this study will help the analysis of skin mechanics. To elucidate further possible mechanisms involved in the SE stretching, a structural modeling is currently being developed by our group (Lafrance *et al.*, submitted).

Chapitre VII
Article numéro 4

Application of Lanir's Structural Model to Tissue Engineered Skin

H. Lafrance[1,2], A. Mitnitski[1], L'H. Yahia[1], L. Germain[2,3], F.A. Auger[2,3]

[1] Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux, Institut de Génie Biomédical
École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7

[2] Laboratoire de Recherche des Grands Brûlés/Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale
Hôpital du Saint-Sacrement, Québec, Québec, Canada, G1S 4L8

[3] Département de Chirurgie, Université Laval
Québec, Québec, Canada, G1K 7P4

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Rina Guignard for her skilled preparation of the light microscopy samples, Martin Cyr and Paule Brodeur for their generous contribution to respectively the programming and the optimization method discussions, Claude Marin for his photographic assistance, and Tony Gibbon for reviewing the manuscript. This work was supported by both NSERC and MRC of Canada, the "Fondation des pompiers du Québec pour les Grands Brûlés", the "Fondation de l'Hôpital du St-Sacrement", and the "Réseau des Grands Brûlés du Fonds de la Recherche en Santé du Québec". L.G. and F.A.A. were recipients of scholarships from the "F.R.S.Q.".

Journal: Transactions of the ASME® Journal of Biomechanical Engineering
Date de soumission: septembre 1997

Sommaire: Cet article illustre le lien entre le comportement en tension et la structure d'équivalents cutanés ancrés cultivés *in vitro*. Une expression analytique qui prédit l'énergie de déformation emmagasinée dans la structure à partir d'une distension, est développée. Cette expression est dérivée en utilisant un modèle mécanique structurel utilisant plusieurs quantités physiques. Ces quantités physiques décrivent la fraction volumique de plusieurs types de fibrilles ou de filaments dans le tissu, le rapport d'allongement caractéristique qui permet de redresser une fibrille ou un filament, la distribution spatiale de plusieurs types de fibrilles ou de filaments dans le tissu, l'élasticité uniaxiale des fibrilles et filaments. Nous évaluons plusieurs de ces propriétés en minimisant l'erreur quadratique entre l'énergie de déformation donnée au tissu (données expérimentales des chapitres V et VI) et l'énergie emmagasinée dans le tissu découlant du modèle structurel de Lanir.

CHAPITRE VII

APPLICATION OF LANIR'S STRUCTURAL MODEL TO TISSUE ENGINEERED SKIN

7.1 Abstract

The application of Lanir's structural approach (1996) to tissue engineered skins presented in this study shows its important value in the functional analysis of tissue engineered skins for clinical and experimental purposes. Based on this microstructural approach, we present a mechanical analysis of four skin equivalent models: especially their corresponding engineered collagen gels, dermal equivalents and *stratum corneum*. The energy values (up to 2 X 10^3 mN•mm) needed to bring a skin equivalent into finite deformed configurations and measured according to an indentation methodology, were modeled into uniaxial strain-energies of collagen fibrils and keratin filaments. A two-fibril morphology-variable model allowed us to estimate that the energy produced was stored in wavy fibrils that were more uniform and repeatable in human collagen gel compared to the widely used bovine collagen gel. A three-fibril orientation-variable model demonstrates how cell-mediated fibril reorganization influences the mechanical response of indented dermal equivalents. We also show that the model, based on keratin filament volume fraction and morphology, could fit the indentation response of the *stratum corneum*. Furthermore, with an increasing number of indentation cycles, we demonstrates that an increasing fraction of free keratin filaments may be responsible for the significant energy decrease.

7.2 Introduction

Skin equivalents (SE) are remarkable products resulting from an emerging science called tissue engineering. Advantages of tissue engineering are numerous especially considering the lack of human skin tissue donors available for the treatment of severe burns (Langer and Vacanti, 1993; Nerem and Sambanis, 1995). SE have proved further to be promising experimental tools to explore the skin physiology (Auger *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1995;

Michel *et al.*, 1997) and a replacement tissue for therapeutic purposes (López Valle *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996). The advantageous aspect of this new approach is the use of living cells which allows tissue remodeling and healing. However, the optimization of SE is still an ongoing project (Germain and Auger, 1995).

The development of tissue engineered skins has demonstrated that skin is a multifunctional organ and thus, skin reconstruction must be realized through a multidisciplinary approach involving, among others, cell biologists, bioengineers and clinicians. This research synergy has been used in several studies to try to understand and optimize the functional properties of SE: i.e. tensile properties (Lafrance *et al.*, 1995a; Lafrance *et al.*, 1995b), percutaneous absorption and lipid analysis (Michel *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1997) and animal grafting (López Valle *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996). Among these studies on SE, the skin mechanics that we consider a primary function, were first approached by evaluating tensile strength characteristics using an indentation methodology (Lafrance *et al.*, 1995b). We had already evaluated using the same indentation methodology the energy that we define as a product of indentation load (P in mNewton) and the indenter's deflection (Δ in mm) (see figure 7.1) needed to bring collagen gels (CG), dermal equivalents (DE) and SE into finite deformed configurations under quasi-static conditions (Lafrance *et al.*, 1995b; Lafrance *et al.*, submitted). From a functional point of view, we consider that energy produced in equivalents is an important characteristic since the external forces are stored by the structural components as energy (W_{stored}). This present study provides answers to the relationship between W_{stored} and elasticity, density and spatial distribution of the SE components through the application of Lanir's structural model. All these physical quantities appear fundamental to us in the development of appropriate SE for many clinical and experimental purposes.

Assuming quasi-static loading conditions, the W_{stored} in a binary system such as SE, can be defined as the summation of a strain-energy function of the entire tissue fibril network (W_f) and an osmotic-energy term (W_Ψ) (Lanir, 1996):

$$W_{stored} = W_f + W_\Psi \qquad (1)$$

Lanir's original work expresses W_f as a function of several fibril properties: their elasticity, volume fraction, recruitment and spatial distribution. Up to now, Lanir's structural model seems to have been overlooked by many health scientists and clinicians

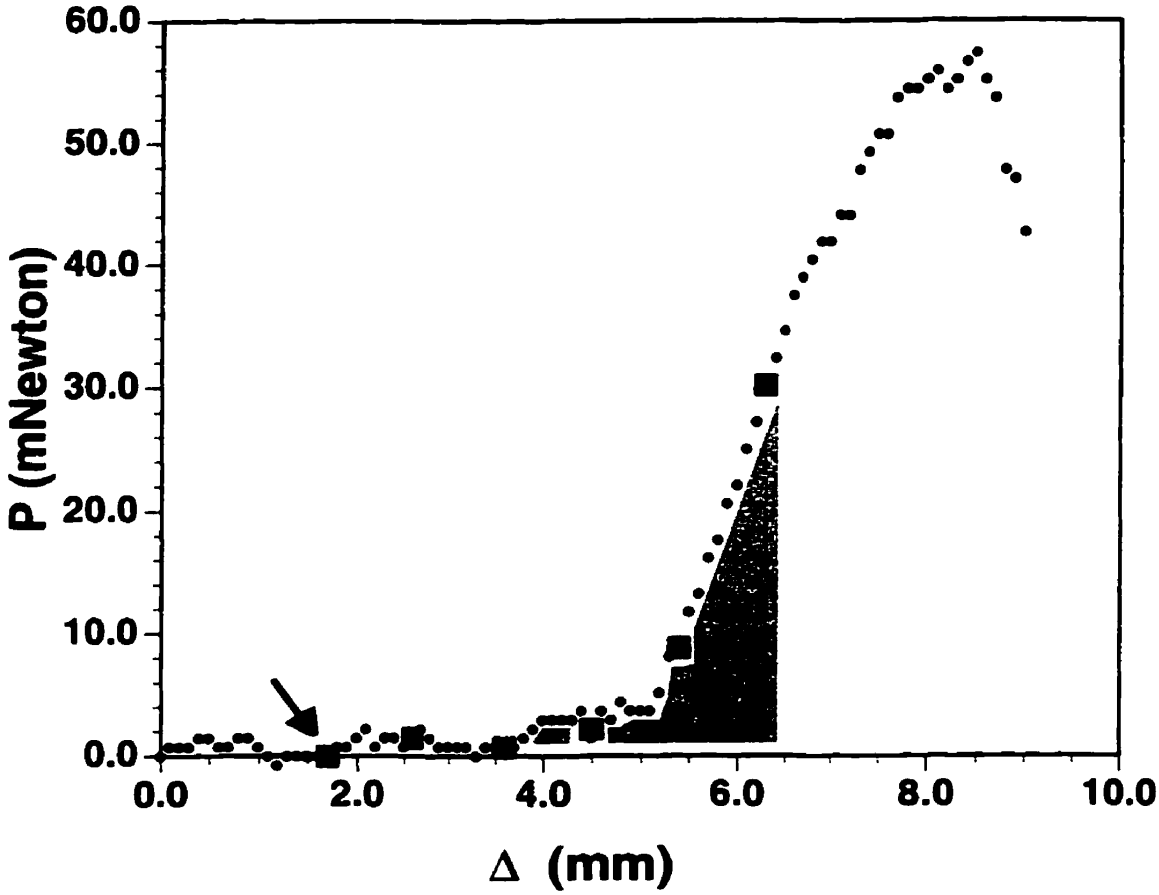


Figure 7.1: Typical indentation curve of a human disk-shaped dermal equivalent (containing fibroblasts, human type I+III collagens, elastin and GAGs): axial force (P) required to produce the deflections (Δ) (from Lafrance *et al.*, 1995b). Six deformed configurations used in the estimation of the structural model (■). The gray surface and black arrow indicates respectively the energy needed for indentation and a loading state in the toe-part of the curve characterizing the elastin network.

probably due to its relatively complex formulation and numerical analysis. In spite of this, we have implemented many studies such as histological analyses of SE, derivations of mathematical equations for SE submitted to an indentation test and optimization programming to apply the structural approach in the mechanical-functional analysis of SE. The merit of this structural approach appears manifest since it is supported by many physical quantities.

7.3 Formulation of the problem

7.3.1 Histological findings of anchored disk-shaped equivalents

A SE is a bilayered structure (see light micrograph of photography 7.1): i.e. epidermal cells seeded upon a DE and cultured *in vitro* (Auger *et al.*, 1995; Germain and Auger, 1995). Briefly, our DE is a disk-shaped anchored CG— consisting mainly of a hydrated network of highly entangled collagen fibrils (Tiollier *et al.*, 1995)— containing human fibroblasts.

Photography 7.1: Light micrograph of a human skin equivalent (SE) cultured *in vitro*. The epidermis (ES) is cultured upon a dermal equivalent (DE) containing fibroblasts, human type I+III collagens, elastin and GAGs. The black arrow indicates the keratin-rich *stratum corneum* of the epidermis cultured at an air-liquid interface. Bar = 50 µm.

This study, is based on previously measured mechanical properties of bovine DE prepared according to the method of Bell *et al.* (1981) with 2 ml type I bovine collagen (2 mg/ml) in a 35-mm-diameter petri dish (Lafrance *et al.*, 1995b; Lafrance *et al.*, submitted). Other experiments were conducted with human DE prepared with 2 ml pepsinized type I:III (63:37) human collagens (2.5 mg/ml) (Imedex, FR) in the same petri dish as bovine DE (Lafrance *et al.*, 1995b; Lafrance *et al.*, submitted). In addition, these last human DE were supplemented (we use the script "+", e.g. DE+) with other macromolecules (0.07 mg of elastin per ml and 0.01 mg of glycosaminoglycans (GAGs)

per ml). In these gels, the fluid was composed essentially of medium, *serum*, and antibiotics and made up more than 50 percent of the initial 2-ml-volume.

After a few days of DE culture, there is collagen gel compaction due to fibroblast traction forces (Stopak and Harris, 1982; Grinnell and Lamke, 1984; Guidry and Grinnell, 1985; 1986; 1987; Tiollier *et al.*, 1990; López Valle *et al.*, 1992; Barocas *et al.*, 1995; Barocas and Tranquillo, 1997) and a volume of fluid drains out of the gel. In an anchored DE system, as we used in our previous tests, this compaction was observed in the direction of the thickness: e.g. a ~2.3-mm-initial thickness contracted down to 10 µm for bovine DE after three weeks in culture (Lafrance *et al.*, 1995b). The anchorage system does not allow compaction in radial directions. The thickness compaction is also less severe in human DE+ than in bovine DE. This comparision may be explained by the fact that the *in vitro* type I:III human collagen self-assembly results in smaller fibrils which are tighter spaced compared to type I bovine collagen fibrils (Tiollier *et al.*, 1990). Also, the electrostatic contributions of GAGs (GAGs water bondings associated to their fixed ionized charge groups as described in Buschmann and Grodzinsky (1995)) help to regulate *in vitro* type I+III collagen self-assembly into a thinner fibril network (Kadler, 1994). However, Guidry and Grinnell (1987) demonstrated that the sulfated GAGs do not inhibit cell traction forces in collagen gel. It was also demonstrated that the gel compaction may be regulated by many other factors such as collagen and fibroblast concentrations (Bouvard *et al.*, 1992), pre-pepsinized human collagen molecules (Auger *et al.*, 1995) and additives to the medium (*serum*, growth factors, etc.) used for the SE culture (Woodley *et al.*, 1991). In addition, the pattern of the fibroblasts observed in our 2-day stable anchored disk-shaped DE suggested that collagen fibrils become parallel to the DE surface (Lopez Valle *et al.*, 1992) but their planar distribution has not yet been defined.

At day-4 of DE culture, human keratinocytes are seeded upon the surface of DE. After three weeks, they form a regenerated *epithelium* composed of epidermal cell on thinner *strata* containing keratins (Auger *et al.*, 1995). Among these *strata*, there is a resulting *stratum corneum* (SC) which plays a significant role in the tensile properties of the whole SE (Lafrance *et al.*, 1995b). In addition, since the formation of a SC may be accompanied by the expression of keratins (Fuchs, 1990) or presence of transglutaminase in suprabasal cells of epidermal *strata* (Auger *et al.*, 1995), it was demonstrated that the

quality of the engineered SC is markedly increased when cultured at an air-liquid interface rather than submerged. Conversely, a severe degradation of DE occurs when SE are cultured at an air-liquid interface rather than submerged. During culture, the SE undergo many structural modifications. The histological features are mostly qualitatively reported in the literature. Up to now, many statistical quantitative analyses, as example, thickness contraction, volume fraction occupied by proteins and fibril distribution were not available. With SE gaining biofunctionnality, many observed features have become established and we made, what we believe, quite reasonable assumptions in order to accomplish the present functional and mechanical modeling.

7.3.2 Basic assumptions

To achieve the microstructural modeling of SE, we have introduced seven assumptions that are summarized as follows (assumption G is presented in the next section) and it should be noted that some of these assumptions have already been fully discussed by Lanir (1996).

(A) We have assumed that three proteins were responsible for the tensile response of the SE. Under indentation load (a biaxial tensile load), the DE response was predominantly related to the collagen network ($k = 2$) (Lafrance *et al.*, 1995b). The collagen network is composed of numerous intermolecular covalent bondings and intramolecular hydrogen bondings. Some of these last bondings are bridged by water molecules that might be related to the viscoelastic nature of the molecule (Suzuki *et al.*, 1980). For human DE+ submitted to low indentation load, we have supposed that an elastin network ($k = 1$) might play a unique role in the mechanical response. Moreover, in human DE+, we have neglected the W_f and W_ψ related to the fixed ionized charge of GAGs. In SE response, an independent keratin network ($k = 3$) present within *epithelium* is superposed on the mechanical contribution of DE (consistent with indentation data and light micrographs of our previous work (Lafrance *et al.*, 1995b)).

(B) We have assumed that the SE response is elastic (no viscoelasticity). This supposes that we have dealt with a response following quasi-static equilibrium loading (i.e. no fluid flow) compatible in our experiments with a low indentation rate (Lafrance *et al.*, 1995b; Lafrance *et al.*, submitted).

(C) We have assumed that affine deformations exist: i.e. because of the numerous interconnectivities between the fibrils (or filaments), the deformation of fibrils may be

derived from the overall strains of the tissue. For the collagen, this assumption is consistent with several published scanning electron micrographs (e.g. Tiollier *et al.*, 1990). In SC, it is well known that keratin filaments interact with desmosomes that interconnect adjacent cells (Lodish *et al.*, 1995).

(D) We have assumed that the W_f is related to the uniaxial strain-energy stored in each fibril (or filament) (w_k in mN•m/m^3, see next section)— that it is derived from the uniaxial stress-strain relationship along each fibril or filament. Consequently, the shear, bending and transverse contact energies of fibrils have been neglected. This assumption was first intended to be applied to collagenous tissues (Lanir, 1983) and later it was applied to the rat skin collagen fibers (Belkoff et Haut, 1991) and myocytes of passive myocardium (Horowitz *et al.*, 1988). In our model, we have employed assumption (D) for the keratin filaments of SC. The micromanipulations (in 100% relative humidity) of corneocytes— dead keratinized cells of SC— conducted by Lévêque *et al.* (1988) revealed mechanical features consistent with our assumption: corneocytes could be easily folded but not readily stretched. Thus, a strain-energy density $\tilde{W}_f$ (in mN•m/m^2) has been assumed considering the summation of the strain-energy contributions of all fibrils and filaments:

$$\tilde{W}_f(\mathbf{E}) = h_0 \int_{\phi} \sum_k S_k^0 \bullet D_k(\phi) \bullet w_k(\lambda_f)\, d\phi \qquad (2)$$

where $\mathbf{E}$ is the Green-Lagrange strain tensor, h_0 is the initial thickness of the tissue, S_k^0 is the initial volume fraction occupied by the fibrils, and $D_k(\phi)$ is a probability density function of the fibril distribution related to a ϕ-angle ($-\pi/2 \leq \phi \leq \pi/2$: in a plane parallel to the flat SE) with respect to the ξ_1-axis presented in figure 7.2.

(E) We have used Young's moduli (K_k) of fibrils (or filament) estimated from previous uniaxial experiments. Formerly, the Young's modulus of elastin from *ligamentum nuchae* such as the one used in our human DE+, was established as being in the order of K_1 = 0.6 MPa (Fung, 1993). Though many researchers (Fung, 1993; Lanir, 1987; Lapière *et al.*, 1988; Viidik, 1973) reported Young's moduli in the order of K_2 = 1 GPa for collagen fibers once they are straightened, we have employed a K_2 in the order of 0.43 GPa as estimated from the force-strain relationships of a collagen fibril and described in the recent work of Sasaki et Odajima (1996b). Sasaki et Odajima (1995a; 1995b) who pointed out — based on Hodge-Petruska molecular packing— the contribution of the

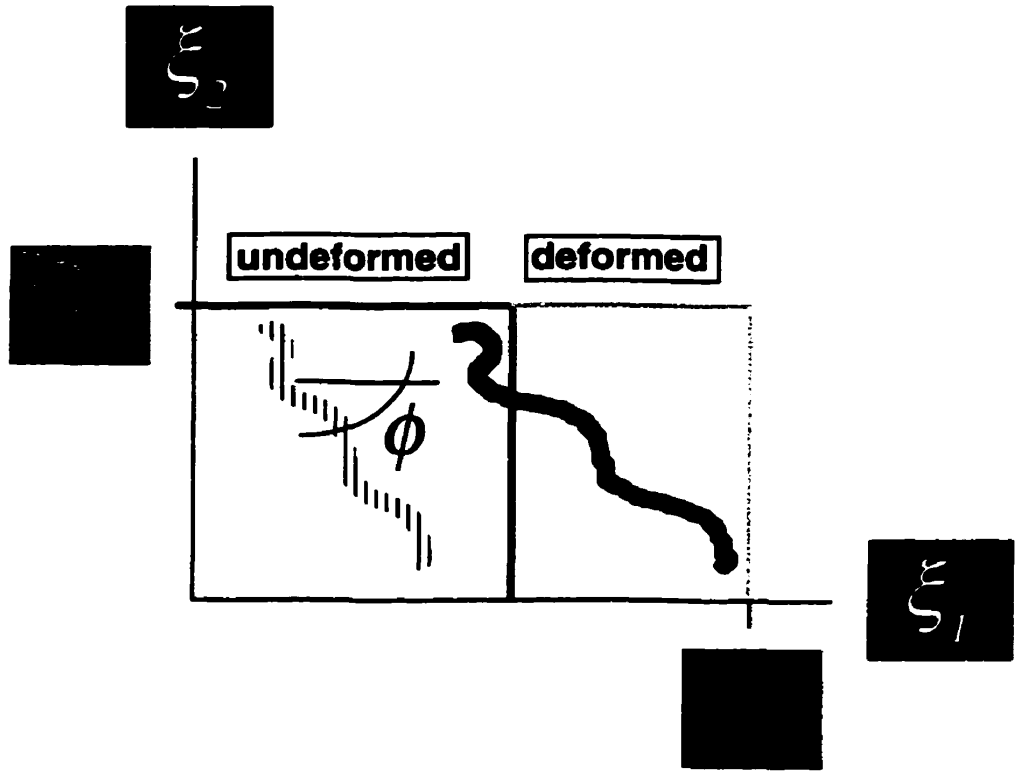


Figure 7.2: Schematic view of the ϕ-angle ($-\pi/2 \leq \phi \leq \pi/2$) of fibrils/filaments around the curvilinear ξ_1 -axis of a flat tissue equivalent. In undeformed configuration, ξ_1-and ξ_2-axis are respectively radial and circumferential axis of disk-shaped tissue equivalents. In deformed configuration, ξ_1- and ξ_2-axis are respectively parallel and meridian. In this indentation problem, λ_2-stretch ratio remained unit (see assumption **G**).

collagen molecule in a fibril elongation. For the keratin filaments, no established data of elasticity has yet been reported. Keratin filaments are formed by aggregation of parallel heterodimers which have a central α-helical coiled-coil core domain (Lodish *et al.*, 1995). Under elongation, it was suggested that the keratins are subjected to a progressive straightening recruitment quite similar to the one of collagen fibrils, and show a transformation of α-chain in β-chain (Rasseneur *et al.*, 1982; Wildnauer *et al.*, 1971). Moreover, It was discussed by Lévêque *et al.* (1988) that «under physiologic conditions the deformation of SC is not truly an elongation of individual cells but rather a conformation change provided by the numerous intersecting furrows which comprise the microrelief of the skin». From the intact SC Young's modulus of Park and Baddiel (1972) in the order of 5 MPa (in 100% relative humidity) and from the corneocyte

Young's modulus of Lévêque *et al.* (1988) in the order of 0.45 GPa (in 100% relative humidity) , it should be assumed if we follow the same practical reasoning of Sasaki et Odajima (1996b) for the collagen structure, that the corneocyte Young's modulus might be a conservative value for a straighten keratin filament but still a more representative value than the SC Young's modulus. Hence, a value for K_3 corresponding to 0.45 GPa has been assumed.

(F) In SE, the planar distribution of both elastin and keratin networks are suggested to be transverse isotropic. This is consistent with the stability of elastin networks (Fung, 1993) and with our findings of corneocyte shape observed in culture (unpublished data). For collagen network, we have assumed that the same transverse isotropy is restricted to acellular CG (Lapière *et al.*, 1988). A transverse isotropic distribution is represented by a uniform probability density function and is described by

$$D_k(\phi) = 1/\pi \tag{3}$$

7.3.3 Fibril and filament mechanics

Based on K_k and a defined stretch ratio for each fibril segment of the network (λ_f, see Kinematics of Fibrils and Filaments section), we have derived w_k as a scalar function of an elastic solid (see eq. 1.4.55, Batoz et Dhatt, 1990). For a single elastin fibril segment ($k = 1$):

$$w_1(\lambda_f) = \frac{K_1}{2}\left(\lambda_f^2 - \lambda_f + 1\right) \tag{4}$$

For both wavy collagen fibril and keratin filament segments (k = 2 and 3), we can derive the following w_k expression based on the sequential straightening of Lanir (1979):

$$w_k(\lambda_f) = \frac{K_k}{2}\int_1^{\lambda_f} R_k(x) \bullet \left[\frac{\lambda_f^2}{x^2} - 2\frac{\lambda_f}{x} + 1\right] dx \tag{5}$$

where $R_k(\lambda_f)$ is a probability density function which defines the progressive straightening recruitment of wavy fibril (or filament) segments in SE, written as:

$$R_k(\lambda_f) = \frac{e^{-\frac{(\lambda_f - \mu_{Rk})^2}{2SD_{Rk}^2}}}{SD_{Rk}\sqrt{2\pi}} \tag{6}$$

and where we suppose that when λ_f reaches a mean (μ_{Rk}), the half of the fibrils (or filaments) are straightened and SD_{Rk} represents the standard deviation which defines the waviness uniformity.

7.3.4 Collagen fibril distribution and volume fractions

We hypothesized that the resulting collagen fibril distribution in DE built from cell traction forces, chemical and mechanical constraints is related to a probability density function (bimodal Gaussian)— a proportion of fibrils within ϕ and $\phi + d\phi$ angles with respect to the ξ_1-axis (see figure 7.2):

$$D_2(\phi) = \frac{I_{\phi 2}}{\pi} + \frac{\left(1 - I_{\phi 2}\right)}{2SD_{\phi 2}\sqrt{2\pi}}\left[e^{-\frac{(\phi-\mu_{\phi 2})^2}{2SD_{\phi 2}^2}} + e^{-\frac{(\phi+\mu_{\phi 2})^2}{2SD_{\phi 2}^2}}\right] \qquad (7)$$

where $I_{\phi k}$ is the amplitude of the uniform distribution term and $\mu_{\phi k}$ and $SD_{\phi k}$ are respectively a mean and a standard deviation of the gaussian terms. This collagen fibril distribution is an acceptable representation of DE which is remodeled from an initial uniform distribution up to preferred longitudinal alignments (López Valle *et al.*, 1992).

The estimation of S_2^0 was based on the compaction of DE and estimated from the following expression:

$$S_2^0 = c_2^{final} \times \frac{V_2^{initial}}{h_0 A} \times PSV_2 \qquad (8)$$

where c_2^{final} (in mg/ml) is the final concentration of collagen used for the preparation of DE, $V_2^{initial}$ is the initial 2-ml-volume of DE at the beginning of the culture, A is the constant 860-mm^2-surface of the anchored specimen, and PSV_2 corresponds to the 0.7 X 10^{-3}-ml/mg-partial specific volume of type I collagen (Noda, 1972 cited in Kadler, 1994). We do not consider in this study any modifications of S_2^0 due to the biosynthesis or degradation. Although the impact of elastin was not significant on DE mechanics, we treated its S_1^0 with the same approach as collagen (eq. 8).

7.3.5 Kinematics of fibrils and filaments

The geometry of the disk-shaped SE in the undeformed reference configuration is simply defined by a radius ($0 \leq R \leq 12.7$ mm), a circumferential angle ($0 \leq \Theta \leq 2\pi$) and the thickness of the specimen (h_0). In the deformed reference configuration (r, θ, z) (see figure 7.3), the middle surface of SE is expressed by:

$$r(R);\ \theta = \Theta;\ z(R) \tag{9}$$

When SE are subjected to large elongations, it may appear laborious to try to understand the kinematics of the whole specimen. If one considers infinitesimal portions of tissue, they all rotate while they stretch. It is very difficult to present a simple geometric interpretation for the stretching of fibrils (or filaments).

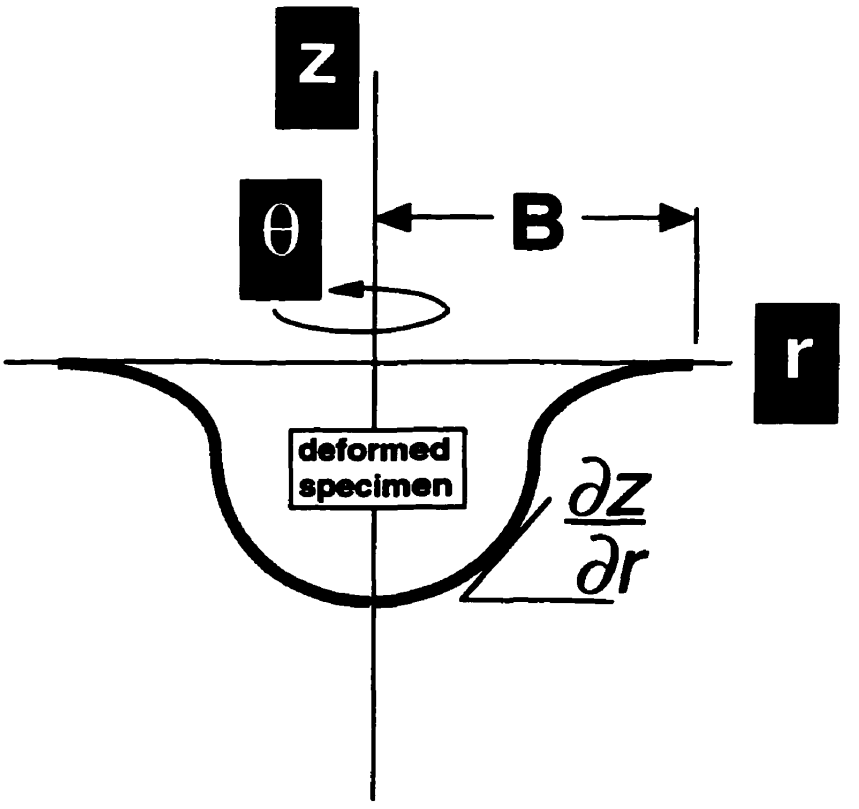


Figure 7.3: Schematic cross-sectional view of the θ-axisymetric middle surface of disk-shaped skin equivalent under a deformed configuration. Radius ($r < B$ where $B = 12.7$ mm); Central axis (z).

To facilitate the understanding of the stretching mechanism, we employ some basic rules of kinematics, especially curvilinear coordinates for surfaces of revolution (an application quite similar to our own is developed in Saada, 1990). We consider the coordinates of any particle in the undeformed configuration (x_i) and the coordinates of that particle in the deformed configuration (y_i) where y_i were single-valued, continuously differentiable functions of x_i and had a unique inverse.

Secondly, we considered our specimens as a surface of revolution formed by the rotation of a curved plane about the z-axis lying in the plane of the curve (see figure 7.3). This curve is called the meridian and its plane is the meridian plane. Let $z(R)$ be the perpendicular from any particle on the surface to the R-axis (see figure 7.3). The equation of a meridian is defined by $z(R)$, and its position is given by the angle θ with the r-axis. The intersections of the surface with a plane perpendicular to the z-axis form circles that we called parallels. For each constant value of R, there is a parallel for which the position is determined. We established the following parametric equations of the surface in the undeformed configuration x_i:

$$x_1(R,\theta) = R\cos\theta;\ \ x_2(R,\theta) = R\sin\theta;\ \ x_3(R,\theta) = 0 \qquad (10)$$

and in the deformed configuration y_i:

$$y_1(R,\theta) = r(R)\cos\theta;\ \ y_2(R,\theta) = r(R)\sin\theta;\ \ y_3(R,\theta) = z(R) \qquad (11)$$

By this formulation, for each constant value of θ, we get a meridian for the surface; and for each constant value of R, we get a parallel for the surface. The meridians and the parallels are taken as the parametric curves and, R and θ are respectively identified with ξ_1- and ξ_2-curvilinear coordinates (see figure 7.2).

The stretch ratio λ of an element of the surface of revolution was defined by (see equation I-8 in Appendix I of Lanir, 1979; Saada, 1990)

$$\lambda = \left(G_{ij}d\xi^i d\xi^j\right)/\left(g_{ij}d\xi^i d\xi^j\right) \qquad (12)$$

where G_{ij} and g_{ij} are metric tensors.

The stretch ratio λ_2 in the ξ_2-direction is given by (see equation I.5, Appendix I):

$$\lambda_2 = \frac{r(R)}{R} \tag{13}$$

and we assume a set of kinematically admissible deformations for axially indented hyperelastic membranes with λ_2 set to 1 (consistent with the work of Haddow *et al.*, 1992— the annulus problem) (assumption (G)). Thus, the stretch ratio λ_1 in the ξ_1-direction is given by (see equation I.5 in Appendix I):

$$\lambda_1 = \left[(\partial r/\partial R)^2 + (\partial z/\partial R)^2\right]^{1/2} \tag{14}$$

By rearranging equation I.5 (see Appendix I), by a method similar to that used by Lanir (1979; 1983), the stretch ratio λ_f of a protein fibril and filament (either collagen, elastin or keratin) originally at angle ϕ with ξ_1-direction (see figure 7.2) is expressed by:

$$\lambda_f^2 = \lambda_1^2 \cos^2\phi + \lambda_2^2 \sin^2\phi \tag{15a}$$

and with the substitutions of λ_1 and λ_2 (equations 13 and 14) and some rearrangements we get

$$\lambda_f = \left(1 + (\partial z/\partial R)^2 \cos^2\phi\right)^{1/2} \tag{15b}$$

Under these conditions, the stretch ratio of fibrils (or filaments) in an indentation test was defined by the $z(R)$-profile of SE (figures 4 and 5) where $z(0)$ corresponds with the central Δ-deflection measured.

7.3.6 General problem

Since the displacement is specified by the total stored energy W_{stored} in a thin disk-shaped SE

$$W_{stored} = 2\pi \int_0^B R\tilde{W}_f \, dR \tag{16}$$

then the displacement may be regarded as function of $W_{stored}(\Delta)$ so that the P-axial force required to produce the Δ-deflection is given by (see figure 7.1)

$$P = \frac{dW_{stored}(\Delta)}{d\Delta} \tag{17}$$

To evaluate the unknown structural characteristics of $\tilde{W}_f$, we have defined a constrained multivariable objective function using a least squares estimate:

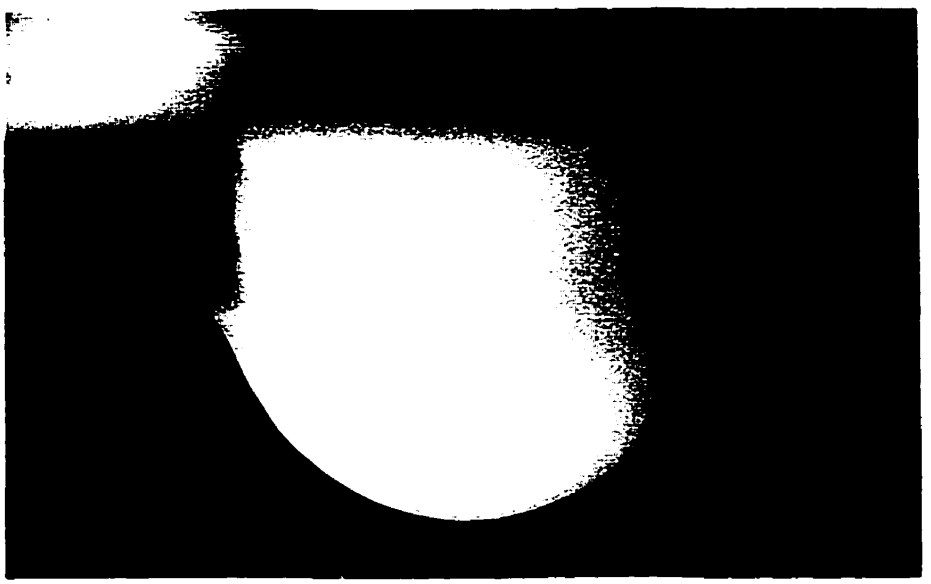
$$f(\mathbf{u}) = \sum_{i=1}^{n} (1/\delta_i)^2 \bullet \left| W^i_{stored}(\mathbf{u}) - \int_0^{\Delta_i} P(\Delta_i)\, d\Delta \right|^2 \qquad (18)$$

where vector $\mathbf{u}$ contains the constrained variables and n is the number of deformed configurations with $\Delta_i \leq \Delta_{i+1}$. The right hand term is the experimentally measured energy at Δ_i (see figure 7.1) and the left hand term is the structural model. The δ_i is the weight coefficient (maximum absolute errors in Piskounov, 1980) calculated from error values of 0.75 mN for P and 0.025 mm for Δ.

7.4 Estimation method

The strategy for the estimation of DE's and SE's $\mathbf{u}$ (eq. 18) has been conducted systematically with several P-Δ relationships obtained from previous tests. These tests reported in Lafrance *et al.* (1995b) and Lafrance *et al.* (submitted) were performed on human CG+ and DE+, on bovine CG and DE, on the *epithelium* cultured upon these last DE, and their corresponding SC or SC-like structures cultured respectively at an air-liquid interface or under submerged conditions. Using this strategy, we have also used the corresponding $z(R)$-profiles of the deformed specimen (up to n = 6) established from scanned photographs (see photography 7.2). First, we estimated μ_{R2},- and SD_{R2}- collagen fibril morphology variables with human CG+ and bovine CG. Subsequently, we employed this last pair of morphological characteristics to estimate $I_{\phi 2}$-, $\mu_{\phi 2}$- and $SD_{\phi 2}$-fibril planar orientation variables of DE (either or not comprised in SE). Prior to changes in collagen fibril morphology, we gave priority to cell-mediated fibril segment reorientation first and foremost. Finally, the S_3^0-, μ_{R3}- and SD_{R3}-variables were estimated once the keratin was established as the only effective component in W_{stored}: i.e. the underlying DE had either ruptured or had suffered advanced degradation.

The minimization of $f(\mathbf{u})$ (eq. 18) was accomplished by using a *sequential quadratic programming* method referred to as "constrained nonlinear optimization" (Constrained Optimizer routine, The MathWorks Inc., Natick, MA)— a description of the algorithm is found in Grace (1992). The $\mathbf{u}$ constrains were defined objectively by using the physical sense of the structural model and the initial $\mathbf{u}$ guesses were determined subjectively by observing several inputs and the $f(\mathbf{u})$ residuals. The minimization was terminated when $f(\mathbf{u})$ decreased by less than 0.01.



Photography 7.2 Photography of a SE (a whitish tissue) under a deformed configuration (Δ = 13.166 mm). The spherical indenter is white and its stroke goes downward.

7.5 Results

In the estimate of the variables for our human CG+, we rejected the use of an elastin network due to a $f(\mathbf{u})$ (eq. 18) as being poorly suited for experimental data. The contribution of elastin resulted in a W_{stored} significantly higher than the experimental right hand term corresponding to the first deformed configurations (see arrow in figure 7.1). This result may be due to an overlooked free elastin fraction in S_1^0 (eq. (2)) rather than a possible unstability of the Young's modulus K_1 in equation (4).

Consequently, only the μ_R- and SD_R-characteristics pertaining to the collagen fibrils were estimated for human CG+ (figure 7.4). The μ_{R2}-characteristic, an average stretch ratio describing the fibril waviness and for which half of the fibrils have been recruited,

remained constant for the human CG+ compared to the higher fluctuations of bovine type I collagen specimens. Also, the SD_{R2}-characteristic, which demonstrates the straightening uniformity of collagen fibrils, appears mostly negligible for the human CG+ (figure 7.4). In conclusion, we consider that all human collagen type I+III fibrils became recruited around a 1.25-μ_{R2} indicating a low fibril waviness, a conclusion that is supported by scanning electron micrographical findings (Tiollier *et al.*, 1990).

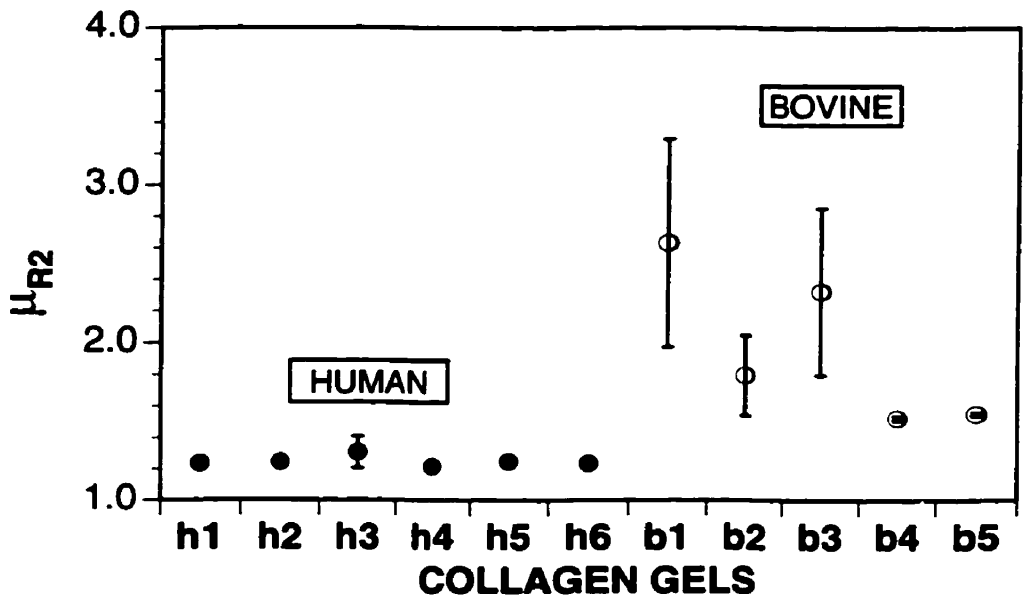


Figure 7.4: Estimated constrained μ_{R2}- and SD_{R2}-variables of anchored human (type I+III collagens, elastin and GAGs) and bovine type I collagen gels. Human μ_{R2} (●); Bovine μ_{R2} (○); SD_{R2} (|). The $f(u)$ residuals estimated for human (h1:h6) and bovine (b1:b5) CG are respectively lower than 15.10 and 1.77. The human and bovine S_2^0 are respectively 1.74 X 10^{-3} and 1.39 X 10^{-3}.

In the further estimation of distribution-characteristics ($I_{\phi 2}$, $\mu_{\phi 2}$ and $SD_{\phi 2}$) for DE, there was a need for physically significant straightening-characteristics such as the ones of human type I+III collagen fibrils. Consequently, we report in this paper only human DE+ characterization (figure 7.5). According to the general bimodal and Gaussian— as opposed to prior uniform in CG— probability density function, we estimate a collagen fibril distribution mainly oriented in a ϕ-angle higher than 0.6 radian and up to $\pi/2$ radian which itself corresponds to the circumferential orientation (ξ_2-axis in figure 7.2) of our disk-shaped DE. Four of our human DE+ (h8, h10:h12) models presented a collagen fibril distribution mostly oriented in a 0.6 up to 0.7-radian-ϕ-angle. This last estimate

may be supported by the circular arrangements of fibroblasts layered on 50-mm-diameter human type I+III CG and observed by Tiollier *et al.* (1990) one day after seeding. Some similar cellular patterns were also reported by López Valle *et al.* (1992) with anchored 60-mm-diameter bovine type I CG at 48 h in culture. In this view, we may consider that the

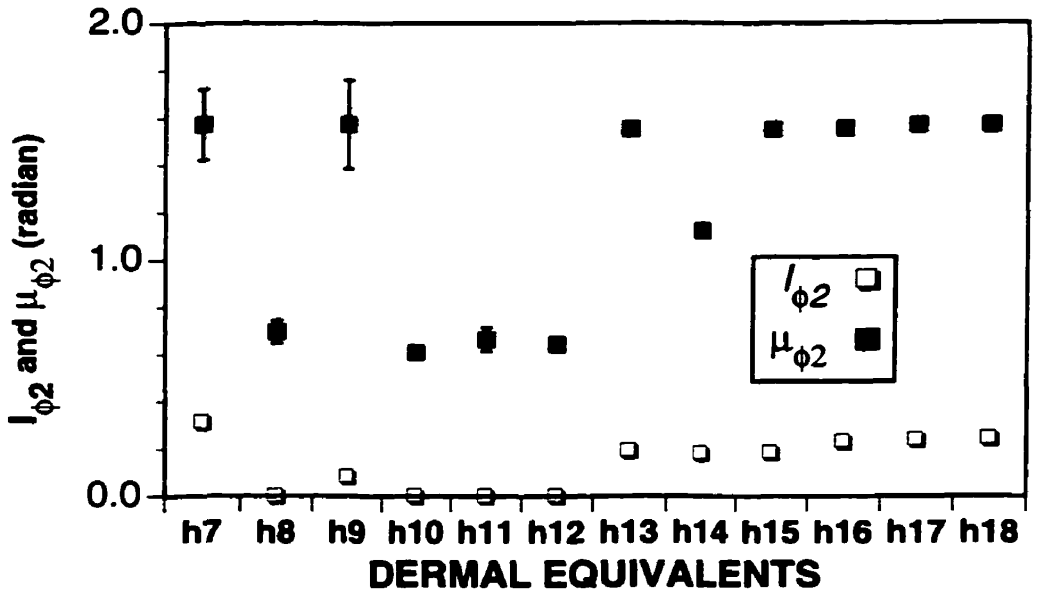


Figure 7.5: Estimated constrained $l_{\phi 2}$-, $\mu_{\phi 2}$- and $SD_{\phi 2}$-variables of anchored human dermal equivalents (fibroblasts, type I+III collagens, elastin and GAGs). $l_{\phi 2}$ (❑); $\mu_{\phi 2}$ (■); $SD_{\phi 2}$ (|). The $f(\mathbf{u})$ residuals of DE were lower than 3 (h7:h12), 500 (h13:h15) or 10^3 (h16:h18). The average 1.248-μ_{R2} and 0.036-SD_{R2} characteristics were used for all estimations. Four deformed configurations were used in h13:h18 estimations.

collagen fibril orientation provides the cell contact guidance in a CG (Dickinson *et al.*, 1994), and we may also deduce a direct fibril-cell correlation from the two latest observations. With the fibroblast-mediated collagen gel tractional structuring, the collagen fibril density in the ξ_1-axis, where the stretching achieved by indentation was maximum, decreased and reduced the amplitude of the W_{stored} -term formulated in the model. On the other hand, the fibril distribution suggested by the human DE+ (h13:h18) cultured for human SE+ presents an orientation mostly in a $\pi/2$-radian-ϕ-angle and the residual proportion was uniformly distributed in a range of 0.18-0.25 radian (see $l_{\phi 2}$, figure 7.5). However, this latest conclusion may not be as founded since we report substantial $f(\mathbf{u})$ residuals in the estimates.

In table 7.1, we present characteristics resulting from keratin-filament networks of several cultured SC or SC-like structures. The $f(\mathbf{u})$ residuals of two thirds of SC cultured at an air-liquid interface are higher in this last analysis since the δ_i are significantly lower than the estimated least squares but they are quite reasonable if we take into account their large ~10^2-ratio of W_{stored} over δ_i (eq. 18). As predicted by the model μ_{R3}-characteristic, the filament's waviness remains somewhat constant in all SE specimens if we exclude **b9** and **b10** ones and hence, independent from either culture conditions and dermal matrices. The μ_{R3}-amplitude fluctuates around a 1.1-stretch ratio. Additionally, the low SD_{R3}-values with the exception of **b9**:**b11** specimens suggest a strong uniformity of the filaments waviness.

The initial volume fractions of keratin filaments (S_3^0) in the 10^{-2}-10^{-3} decades are presented in table 7.1. Even if a thicker SC is obtained with human SE+ cultured at an air liquid interface compared with bovine ones, we estimate with these last bovine SE a S_3^0 somewhat higher than human SE+. Also, we computed in both human and bovine SE, S_3^0 values which were higher when both SE were brought to an air-liquid interface during culture. In addition, we calculated higher S_3^0 for bovine SE under submerged conditions compared to the human SE+ in the same conditions. With SE cultured under submerged conditions, we calculated that S_3^0 decreased with cycle number (figure 7.6) and consequently, an increasing proportion of free keratin filaments was revealed from the second up to the twentieth cycle.

Table 7.1. Estimated constrained S_3^0-, μ_{R3}- and SD_{R3}-variables of anchored human (**h**) or bovine (**b**) skin equivalents (**SE**) cultured in immersion (**i**-subscript) or at an air-liquid interface (**al**-subscript). All the human dermal equivalents prepared for human SE were elastin- and GAGs-supplemented. The $f(\mathbf{u})$ residuals are presented.

SE Specimens	S_3^0 (X 10^{-3})	μ_{R3}	SD_{R3}	$f(\mathbf{u})$
h SE_i #16 †	2.3	1.154	0.070	15.26
h SE_i #17 †	1.8	1.166	0.067	7.17
h SE_i #18 †	1.7	1.118	0.090	3.44
h SE_{al} #19 §	3.9	1.188	0.029	95.25
h SE_{al} #20 §	3.4	1.082	0.021	135.58
h SE_{al} #21 §	4.4	1.151	0.029	134.07
b SE_i #6 ¶	3.4	1.100	0.010	10.66
b SE_i #7 ¶	4.4	1.173	0.010	7.21
b SE_i #8 ¶	4.7	1.153	0.082	17.10
b SE_{al} #9 ¥	98.2	1.000	9.948	3.20
b SE_{al} #10 ¥	89.9	2.728	0.782	1.92
b SE_{al} #11 ¥	6.9	1.000	0.165	3.17
b SE_{al} #12 ¥	7.1	1.017	0.010	97.97
b SE_{al} #13 ¥	10.7	1.050	0.021	34.28
b SE_{al} #14 ¥	6.0	1.030	0.010	46.15

Averaged thickness (h_0) of keratin network used in estimates: (†) ~0.015 mm; (§) ~0.060 mm; (¶) ~0.005 mm; (¥) ~0.030 mm.

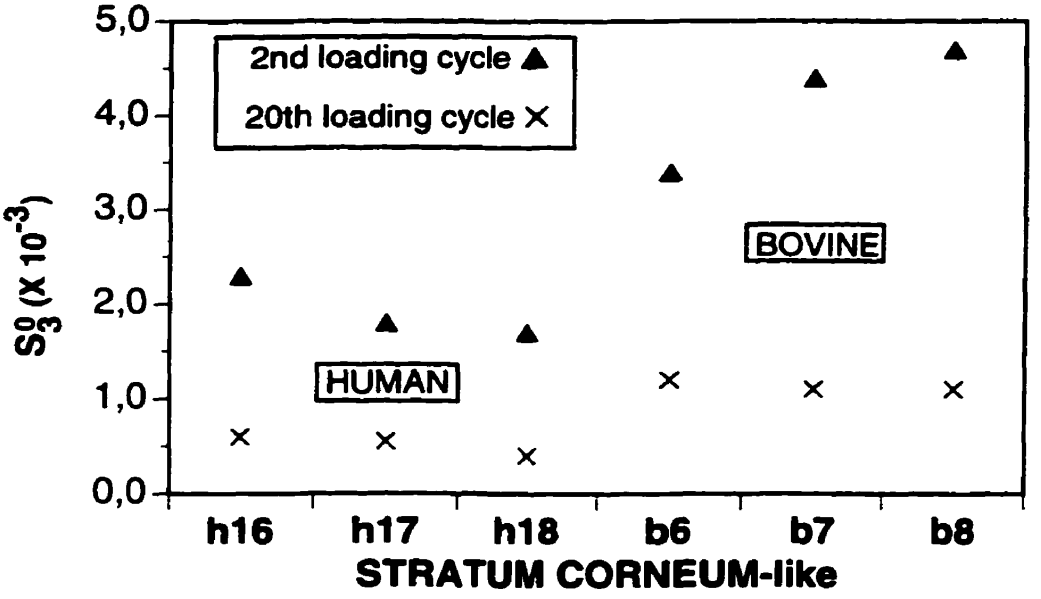


Figure 7.6: Estimated constrained S_3^0-variable of anchored skin equivalents cultured in immersion following their second loading cycle (▲, see S_3^0 of table 7.1) and their twentieth loading cycle (+). The respective and estimated μ_{R3} and SD_{R3} variables of each *stratum corneum*-like structure submitted to a second loading cycle (see table 7.1) were used in the estimations after the twentieth loading cycle. The $f(\mathbf{u})$ residuals were lower than 27 for all estimations.

7.6 Discussion

The capacity to analyse the mechanical function of SE that we are reporting is at a focal point of skin mechanics. There are needs for biomechanical methods in the functional analysis of tissue engineered skin and conversely, SE may greatly serve the biological repeatability in the biomechanical evaluations of skin (e.g. detecting microstructural changes in skin). To explore the mechanical function of SE, the structural approach introduced by Lanir (1979; 1983) represented a promising issue since up to now the only alternative has been the "hand and eye" method. In this branch of biomechanics, the development of a mathematical model which describes a number of components of the skin according to cell-mediated morphometric details and existing knowledge on mechanics, is a major step. Many of the potential merits, the advantages and also the limits of this structural approach were suggested by Lanir in previous papers (e.g. Lanir, 1983; 1996).

The structural model presented in this paper is derived from the microstructure and characteristics of collagen and keratin units within SE. It predicts the indentation P-Δ relationships that we have experimentally obtained from previous biaxial tensile tests performed on CG, DE and SE and published elsewhere (Lafrance *et al.*, 1995b; Lafrance *et al.*, submitted). One major problem in solving this model is the excessive number of structural characteristics involved. Against this, the number of unknown characteristics does not exceed the number of constraints available based on tissue culture observations and established data on skin mechanics. Under these circumstances, this physical model appear to generate good consistent results.

As discussed by Belkoff and Haut (1991) on the use of a structural approach, three important objectives must be respected to be effective: (i) significance of physical characteristics estimated, (ii) uniqueness of solution and (iii) fitting of experimental data. All estimates presented in this paper, except those of DE cultured with keratinocytes, are in agreement with these objectives. In fact, the only exception (the SE cultured in immersion) which displayed a less acceptable fitting, may be explained by the selection of a deformed configuration associated with the occurrence of microstructure damages and a break in the indentation P-Δ curve. Consequently, the model is suited for a convex indentation curve which describes a "toe" part followed by a straight part (see figure 7.1).

In the estimation of μ_{R2}- and SD_{R2}-waviness characteristics, we find that human type I+III collagen fibrils used in CG+ become less wavy and more uniform than bovine type I collagen fibrils. Moreover, the waviness of human collagen type I+III fibril from one specimen to another is constant. In rat skin, Belkoff and Haut (1991) presented 1.2- up to 1.5-μ_{R2} wavinesses (transduced for the comparison needs in a stretch ratio λ) but many methodological differences may exist with our estimates (e.g. load distributions). Qualitatively, the scanning electron micrographs demonstrated this constancy in human type I+III CG (Tiollier *et al.*, 1990). As studied by Belkoff and Haut (1991), a waviness decrease accompanied by fibril uniformity occurred with aging over a 4-month period. This last conclusion suggests that human type I+III collagen of our CG would be a mature fibril structure. In contrast with waviness characteristic dispersion presented by animal specimens, the repeatability of our results represents a firm advantage for our functional and mechanical analysis of skin submitted to both biochemical and biophysical stimuli.

Four our human DE+, we assumed that the model predicted the energy needed to indent the sample by modifying the angular distribution of human type I+III collagen fibrils. Although it was accepted that the above fibril distribution accounts for the reorganization of the CG (Grinnell and Lamke, 1984), the fibrillar morphometric changes solely induced by the application of cell traction-forces to the collagen fibrils have to be further studied. Nevertheless, the resulting CG reorganization estimated by the model was consistent with the fibril circular-like orientation suggested by fibroblasts observed in larger dermal equivalents under light microscopy (López Valle *et al.*, 1992, Tiollier *et al.*, 1990). Recently, Barocas and Tranquillo (1997) have estimated with their anisotropic biphasic theory of tissue-equivalent mechanics, an equal increase in radial and circumferential fibril alignment.

Elsewhere, the estimations of μ_{R3}- and SD_{R3}-waviness characteristics constitute original results in functional analysis of SC and SC-like cultured *in vitro*. No quantitative description are available from the literature on the real waviness of keratin filaments in cultured *epithelium*. Despite this underdocumented field, the structural model proposes characteristics which describe very well straightened keratin filament ($\mu_{R3} \approx 1.1$ and low SD_{R3}). Since the keratin network supports large extensions in our experiments

(photography 7.2), the α-helical coiled-coil core domain of filament-subunit keratin as mentioned in Lodish *et al.* (1995) may undergo in an elastomer-like manner a high level of straightening in their β-chain transformation. However, more investigations have to be realized in order to obtain normalized K_3. Lévêque *et al.* (1988) stated that their estimated K_3 = 0.45 GPa which has been used in this study, was an underestimated value. For example, with a higher K_3-characteristic (assuming the same S_3^0 estimated from K_3 = 0.45 GPa), the morphometric characteristics suggested by the model would be adjusted in a wavier and less uniform state. We also established with the model that the increasing cycle numbers induced a proportion of free keratin filaments in both type of SC-like cultured under immersion and thus, the appearance of stretch-dependent microdamages. This mechanism has recently been treated by Emery *et al.* (1997) as a strain-softening. In SC there could be numerous other intra or intercellular proteins responsible for microdamages (e.g. desmogein and desmocollin in desmosomal structures (Lodish *et al.*, 1995)).

In conclusion, our indentation methodology developed especially for disk-shaped SE models (Lafrance *et al.*, 1995a) provides original and representative measurements of the SE mechanical functions for strength, elasticity and the energy needed to deform them under finite deformations. However, we needed a detailed structural interpretation of the measurements to lead us to a systematic optimization of SE mechanical function. This study endeavors to apply a theoretical structural approach developed by Lanir to new tissue engineered skins which have allowed to a better understanding of how structural characteristics (elasticity, volume fraction, waviness and planar distribution) of both collagen and keratin units may influence the SE mechanical functions in a biaxial tension-sense. However, it would be desirable to elucidate these characteristics with more averaged quantitative histological observations or with an accurate predictive theoretical model (e.g. Barocas and Tranquillo, 1997) if an optimized SE model for other specialized biological functions is going to be applied. Finally, the computer simulation techniques used to verify the CG, DE and SC (or SC-like structure) of SE models provides an efficient method to predict the possible consequences of cosmetic, toxicological and pharmacological treatments in the mechanical functions of skin and also, in studying the skin physiology.

7.7 Appendix I: Derivation of equations (13-14).

If we identify ξ_1 and ξ_2 respectively by R and θ, for the parametric equations of the surface in the undeformed configuration (R, $\Theta = \theta$, Z), we have:

$$\frac{\partial x^m}{\partial \xi^1} = (\cos\theta, \sin\theta, 0) \qquad \text{(I.1)}$$
$$\frac{\partial x^m}{\partial \xi^2} = (-R\sin\theta, R\cos\theta, 0)$$

and, for the parametric equations of the surface in the undeformed configuration (9), we have:

$$\frac{\partial y^m}{\partial \xi^1} = \left(\frac{\partial r}{\partial R}\cos\theta, \frac{\partial r}{\partial R}\sin\theta, \frac{\partial z}{\partial R}\right) \qquad \text{(I.2)}$$
$$\frac{\partial y^m}{\partial \xi^2} = (-r\sin\theta, r\cos\theta, 0)$$

Consequently, the metric tensor (§6.3 in Saada, 1993) in the undeformed configuration is given by:

$$g_{11} = 1$$
$$g_{12} = g_{21} = 0 \qquad \text{(I.3)}$$
$$g_{22} = R^2$$

and, the metric tensor in the deformed configuration is given by:

$$G_{11} = (\partial r/\partial R)^2 + (\partial z/\partial R)^2$$
$$G_{12} = G_{21} = 0 \qquad \text{(I.4)}$$
$$G_{22} = (r)^2$$

From the equation (12), the stretch ratio of an element for our surface of revolution, is expressed by:

$$\lambda^2 = \frac{\left[\left((\partial r/\partial R)^2 + (\partial z/\partial R)^2\right)(dR)^2 + (r)^2(d\theta)^2\right]}{\left[(dR)^2 + R^2(d\theta)^2\right]} \qquad \text{(I.5)}$$

On one hand, the stretch ratio of an arc along a parallel (λ_2), is defined when dR is zero. On the other hand, the stretch ratio of an arc along a meridian (λ_1), is defined when $d\theta$ is zero.

CHAPITRE VIII
CONCLUSION

Au niveau fonctionnel, la peau normale humaine exerce une importante fonction mécanique. En particulier, elle alloue des distensions qui permettent de dissiper ou de redistribuer l'énergie mécanique de nature physiologique ou extrinsèque dans notre organisme. Lors de la destruction de la peau il faut donner au patient, dans les plus brefs délais, un tissu de remplacement possédant la fonction mécanique de la peau normale humaine.

Nos études menées dans le cadre de cette thèse démontrent que nos équivalents cutanés cultivés *in vitro* possédant des propriétés biochimiques et des caractéristiques histologiques proches de la peau normale humaine (Auger *et al.*, 1995), présentent plusieurs propriétés fonctionnelles mécaniques comparables à celles de la peau normale humaine.

Pour ces études, nous avons développé de nouveaux outils permettant d'évaluer la fonction mécanique des équivalents cutanés cultivés *in vitro*. Nos recherches sur l'évaluation de la fonction mécanique de la peau normale humaine ont démontré que le développement de nouvelles méthodes d'évaluation objectives était nécessaire pour notre application des équivalents cutanés. D'une part, l'équivalent cutané deviendra dans les prochaines années LE modèle cutané le plus convoité pour de nombreux travaux expérimentaux de pharmacologie, de toxicologie, de cosmétique et de physiologie. Ceci s'explique par le fait que l'équivalent cutané démontre une variabilité moindre que celle des modèles animal et humain. Pour toutes ses étapes de production, l'équivalent cutané subit un ensemble de contrôles en vue d'obtenir une structure cutanée optimale et reproductible. D'autre part, parmi toutes les évaluations produites sur de la peau normale humaine, il n'existe pas de méthodologie répondant directement aux besoins de nos équivalents cutanés ancrés permettant de mener une évaluation rapide, simple et précise de la fonction mécanique.

Dans cette nouvelle méthodologie que nous avons développée, on compte en premier lieu une méthode de perforation qui permet la distension de gels de collagène, de derme équivalents, de *stratum corneum* et d'équivalents cutanés. Avec cette méthode, nous pouvons évaluer la résistance mécanique à la tension, le comportement en tension, l'évolution du comportement en tension en fonction du nombre de cycles de distension et en fonction du temps d'application d'une distension de ces tissus. En second lieu, nous avons construit un outil de modélisation mécanique capable d'intégrer les comportements de tension des équivalents cutanés. Il s'agit d'un modèle structurel (Lanir, 1996) que nous avons adapté au cas des équivalents cutanés. Ce modèle structurel étant pourvu de sens physique, nous pouvons préciser la contribution et le rôle des composantes dans l'accomplissement de la fonction mécanique des équivalents cutanés. Cette méthodologie constitue la principale contribution originale de notre travail.

À l'aide de notre nouvelle méthodologie, nous avons évalué la qualité mécanique de nouveaux modèles de derme équivalent et d'équivalent cutané ancrés possédant des propriétés histologiques et biologiques très intéressantes (Auger *et al.*, 1995). Bien que pour ces dernières propriétés l'usage d'un derme équivalent "humain" composé de collagène humain de types I et III, d'élastine et de GAGs soit favorisé par rapport au derme équivalent "bovin"[16] (composé de collagène bovin de type I), le derme équivalent humain n'accroît pas la résistance mécanique des équivalents cutanés. Tout comme le derme équivalent bovin, le derme équivalent humain possède un comportement en tension à trois phases comparables à celui de la peau normale humaine. Le comportement en tension des dermes équivalents humains comme celui des dermes équivalents bovins s'altère plus rapidement suivant les premiers cycles de distension. En particulier, nos gels de collagène dissipent une forte quantité d'énergie à l'intérieur de leur premier cycle de distension. Avec le modèle structurel, nous pouvons démontrer qu'il existe une différence microstructurale entre les dermes équivalents humains et bovins puisque nous avons estimé chez les fibrilles de collagène des dermes équivalents humains une ondulation beaucoup plus faible et homogène que celles des dermes équivalents bovins. Ce dernier résultat peut contribuer en partie au phénomème de contraction macroscopique (causée par les tractions cellulaires) plus grande chez les dermes équivalents ancrés bovins

---

16 Une grande proportion d'équivalents cutanés sont produits avec du collagène dermique de source animale sans pour autant que leurs effets physiologiques et immunologiques aient été démontrés *in vivo* (Auger *et al.*, 1995).

qu'humains sachant que l'aspect convoluté des fibrilles de collagène donne aux fibrilles une plus grande mobilité.

D'autre part, comme un épiderme cultivé sur un derme équivalent à une interface air-liquide constitue une structure possédant les traits histologiques et une qualité fonctionnelle de barrière cutanée comparables à l'organe cutané (Auger *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1995), nous avons mis en évidence, toujours avec notre nouvelle méthode, les propriétés fonctionnelles mécaniques des *stratum corneum* constituant ces épidermes. Nos travaux démontrent que malgré l'usage de la condition d'air-liquide, les épidermes de culture peuvent présenter une résistance mécanique moindre que celle des épidermes cultivés en immersion[17] . En contrepartie, l'usage d'un derme équivalent humain et de la condition de culture air-liquide pour la production d'un équivalent cutané accroît de façon impressionnante la résistance mécanique du *stratum corneum* résultant de cette culture cutanée. Par ailleurs, nous avons démontré que les épidermes cultivés en air-liquide et en immersion constituent d'excellents modèles physiologiques puisque ceux-ci incluent en totalité le comportement en tension *in vivo* de l'épiderme et en particulier, la phase initiale où aucune force n'est perçue pendant l'extension (Rasseneur et al., 1982). Au niveau structurel, nous avons pu démontrer l'influence de la plasticité (une somme de microdommages) de la structure épidermique sur le comportement en tension suivant des distensions répétées. Nous avons pu estimer à l'aide du modèle structurel que l'accumulation de microdommages à l'intérieur de l'épiderme serait une des causes probables de la dissipation d'énergie mesurée lors des premiers cycles de distension.

Au chapitre 2, nous avons fait état des problèmes significatifs de standardisation relatifs aux propriétés fonctionnelles mécaniques de la peau *in vivo* et du retard au niveau de la compréhension de cette fonction. Pour cette raison, il n'existe pas de standard "idéal" en ce qui concerne les propriétés mécaniques de la peau normale humaine, ce qui rend d'autant plus complexe les comparaisons que nous désirons faire avec les équivalents cutanés. Cet état des connaissances ne signifie pas pour autant que la fonction mécanique

---

17 Les premières cultures d'équivalents cutanés étaient produites en immersion. Dans cette technique, le mode de diffusion des nutriments vers les kératinocytes est moins physiologique que la culture en air-liquide (voir revue de Michel, 1995).

de la peau normale humaine est une question de second ordre, mais plutôt qu'elle est beaucoup plus complexe que certains chercheurs l'auraient souhaité.

Dans ce travail de recherche, les expérimentations commandent des conditions métrologiques extrêmes. Les expériences, menées sur des tissus vivants, ajoutent à la complexité de cette recherche. En conséquence, la validité des matériaux en biocompatibilité ainsi que des systèmes mécaniques nécessitent des plans d'expériences additionnels. Du côté de l'élaboration d'un équivalent cutané, la validité des équivalents cutanés repose sur des protocoles complexes. Nous considérons en vertu de ces caractéristiques et des résultats obtenus que notre méthode est efficiente.

Par contre, elle entraîne des considérations théoriques au niveau de la modélisation beaucoup plus complexes que nous l'aurions imaginées: considérons par exemple de grandes déformations combinées aux rotations d'un corps et de distribuer ces déformations selon un champ non-homogène, tel qu'observé dans notre essai de perforation. Pour le moment, nous l'avons démontré au chapitre 7, les champs de déformations sont estimés de manière indirecte au moyen d'analyses photographiques. À notre avis, il serait nécessaire d'accroître la résolution de ces estimations des champs de déformation à l'aide de mesures directes sur les équivalents. Dans cette optique, une des possibilités envisagées modifie le poinçon hémisphérique utilisé pour la perforation de nos spécimens par un poinçon tubulaire. Ce perforateur tubulaire aurait pour effet de créer une surface pour laquelle les déformations sont homogènes et ne sont pas dépendantes de la géométrie du poinçon (Kafka, 1996). En second lieu, l'ajout d'une vue microscopique de part et d'autre de la surface de l'équivalent cutané déformé constituerait un avantage certain dans l'analyse de ses déformations.

Afin de comprendre les liens entre les propriétés mécaniques du comportement en tension et les composantes des équivalents cutanés, nous avons défini une fonction objective minimisant l'erreur quadratique entre l'énergie de perforation donnée au spécimen que nous avons mesurée et l'énergie emmagasinée dans le spécimen prédite par le modèle structurel. Ce dernier est défini à partir des types de protéines ainsi que la fraction volumique, l'élasticité, la forme et la distribution des fibrilles protéiques. De cette façon, la solution obtenue dépend de la précision de nos mesures de perforation et du modèle structurel.

Pour le modèle structurel, nous avons supposé que trois types de protéines (le collagène, l'élastine, les kératines) contribuent à la réponse mécanique en tension des équivalents cutanés. En réalité, la présence de GAGs peut contribuer sous forme d'énergie osmotique (Buschmann et Grodzinsky, 1995; Comper et Laurent, 1978; Lanir, 1996) à contrebalancer l'énergie emmagasinée dans les dermes équivalents humains. Pour calculer cette énergie, des mesures sur la variation de volume du derme doivent être effectuées. De plus, l'énergie est emmagasinée par les fibrilles ou filaments sous la forme d'énergie de déformation uniaxiale mais d'autres modes de transmission d'énergie, tel que les contacts transverses entre les fibrilles, pourraient être impliqués. Pour notre modélisation, le module de rigidité en tension des filaments de kératines est celui d'un cornéocyte, une structure kératinisée de plus grande échelle (Lévêque *et al.*, 1988). En somme, il est impératif que d'autres expérimentations puissent nous donner des quantités physiques qui soient de plus en plus représentatives de la microarchitecture des équivalents cutanés afin de pouvoir procéder à l'aide de ce modèle structurel à des essais prédictifs de l'équivalent cutané dans l'exercice de sa fonction mécanique. Avec ce modèle, on peut viser à prédire le comportement en tension d'équivalents cutanés dans un contexte de tensions multiaxiales *in vivo* afin d'assister les opérations cliniques des greffes.

Nous pensons qu'au cours des prochaines années il y aurait un avantage certain à rendre notre modèle structurel plus "vivant". En ingénierie tissulaire, il existe déjà plusieurs techniques permettant de guider le développement de la microstructure des équivalents cutanés. Comme les cellules (fibroblastes et kératinocytes) constituent en quelque sorte des «usines» et des «architectes», la présence de ces cellules peut influencer les propriétés microstructurales des équivalents cutanés. Par exemple, la fraction volumique d'un réseau d'un type de protéines pourrait être corrélée à des mécanismes de biosynthèse, de dégradation et de différenciation cellulaire. D'autre part, la distribution des fibrilles de collagène est organisée en présence de fibroblastes, soit par mitose ou migration. En présence de fibroblastes, le réseau de fibrilles est sous l'influence de forces de tractions cellulaires génératrices de la réorganisation de la microarchitecture. Nous pourrions parvenir à ce but au moyen d'un suivi mécanique de concert avec les suivis biochimiques et histologiques plus fréquents de nos équivalents cutanés.

Finalement, les connaissances issues des expériences cliniques et des expériences scientifiques *in vitro* concernant la réponse cutanée aux *stimuli* mécaniques soulèvent un important concept, soit celui de "l'adaptation cutanée" (Sanders *et al.*, 1995). Le but des traitements cliniques devrait être d'encourager l'adaptation de la peau à tolérer des *stimuli* mécaniques différents auxquels un patient souffrant de maladie chronique ou d'handicap physique pourrait devenir exposé pour le reste de sa vie. L'adaptation cutanée n'est pas optionnelle, elle est critique. Jusqu'ici, ce concept est sous-documenté et nous pensons que notre système de mesure et de modélisation pourrait servir d'outil à la compréhension de l'adaptation cutanée, à distinguer un état physiologique stable d'un état pathologique.

En perspective, plusieurs autres nouvelles études sont envisagées afin d'ajouter à la compréhension de la mécanique des ÉC:

- Étudier l'endommagement des ÉC soumis à des déformations finies pour des conditions quasi-statiques. Il y aurait lieu également dans ce contexte de préciser au niveau microstructural quelles sont les quantités physiques (fraction volumique, distribution spatiale des fibrilles) qui régissent les mécanismes de plasticité des ÉC.
- Étudier l'effet du temps combiné à l'endommagement sur les propriétés mécaniques fonctionnelles des ÉC. Ajouter le comportement viscoélastique des fibrilles de collagène et l'écoulement du fluide interfibrillaire comme mécanismes de dissipation d'énergie.
- Étudier l'évolution des propriétés mécaniques fonctionnelles de la peau en rapport avec les maladies génétiques et autres pathologies chroniques.
- Étudier à l'aide de l'ÉC le développement des lignes de Langer du tissu cutané : une adaptation cutanée naturelle.
- Étudier le comportement en tension d'une ÉC dont le DÉ est confiné de façon comparable à la situation d'un derme *in vivo*.
- Étudier l'évolution des propriétés mécaniques fonctionnelles des ÉC en fonction de leur développement *in vivo* (sur un modèle animal).
- Étudier l'effet de la friction/compression sur les propriétés mécaniques fonctionnelles des ÉC.

BIBLIOGRAPHIE

ADACHI, E. et HAYASHI,T. (1985). *In vitro* formation of fine fibrils with a D-periodic banding pattern from type V collagen. Coll. Rel. Res., 5, 225.

ADKINS, J.E. et RIVLIN, R.S. (1952). Large elastic defomations of isotropic materials IX. The defomation of thin shells. Phil. Trans. Royal Soc., 244, 505-531.

AGACHE, P., MONNEUR, C., LÉVÊQUE, J.L. et de RIGAL, J. (1980). Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. Arch. Dermatol. Res., 269, 221-232.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WATSON, J.D. (1995). Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc., N.Y., 264-268.

ALEXANDER, H., COOK, T.H. (1977). Accounting for natural tension in the mechanical testing of human skin. J. Invert. Dermatol., 69, 310-314.

ALLEN, T.D., SCHOR, S.L. et SCHOR, A.M. (1984). An ultrastructural review of collagen gels, a model system for cell-matrix, cell-basement membrane and cell-cell interactions. Scan. Electron Microsc., 1, 375-390.

ALLGÖWER, M., SCHOENENBERGER, G.A. et SPARKES, B.G. (1995). Burning the larges immune organ. Burns, 21, s7-s47.

ALLMAN, R.M. (1989). Pressure ulcers among the elderly. New. Engl. J. Med., 320, 850-853.

AUGER, F.A., LÓPEZ VALLE, C.A., GUIGNARD, R., TREMBLAY, N., NOËL, B., GOULET, F. et GERMAIN, L. (1995). Skin equivalent produced with human collagen. In Vitro. Cell. Dev. Biol., 31, 432-439.

BAKER, S.R. (1991). Fundamentals of expanded tissue. Head Neck, 13, 327-333.

BARARDESCA, E., de RIGAL, J., LÉVÊQUE, J.L. et MAIBACH, H.I. (1991). *In vivo* biophysical characterization of skin physiological differences in races. Dermatologica, 182, 89-93.

BARBENEL, J.C. et EVANS, J.H. (1977). The time-dependant mechanical properties of skin. J. Invest. Dermatol., 69, 318-320.

BAROCAS, V.H. et TRANQUILLO, R.T. (1994). Biphasic theory and in vitro assays of cell-fibril mechanical interactions in tissue equivalents gels. Cell mechanics and cellular engineering. V.C. Mow, F. Guilak, R. Tran-Son-Jay, R.M. Hochmuth, Springer-Verlag Inc., N.Y., 185-194.

BAROCAS, V.H. et TRANQUILLO, R.T. (1997). An Anisotropic Biphasic Theory of Tissue-Equivalent Mechanics: the Interplay Among Cell Traction, Fibrillar Network Deformation, Fibril Alignment, and Cell Contact Guidance. J. Biomech. Eng., 119, 137-145.

BAROCAS, V.H., MOON, A.G. et TRANQUILLO, R.T. (1995). The fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force-Part 2: Measurement of the cell traction parameter. J. Biomech. Eng., 117, 161-170.

BELKOFF, S.M. et HAUT, R.C. (1991). A structural model used to evaluate the changing microstructure of maturing rat skin. J. Biomech., 24, 711-720.

BELL, E., EHRLICH, H.P., BUTTLE, D.J. et NAKATSUJI, T. (1981). Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. Science, 211, 1052-1054.

BELL, E., IVARSSON, B. et MERRILL, C. (1979). Production of a tissue-like structure by concentration of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1274-1278.

BELL, E., ROSENBERG, M., KEMP, P., GAY, R., GREEN, G.D., MUTHUKUMARAN, N. et NOLTE, C. (1991). Recipes for reconstituting skin. J. Biomech. Eng., 113, 113-119.

BELL, E., SHER, S., HULL, B., MERRILL, C., ROSEN, S., CHAMSON, A., ASSELINEAU, D., DUBERTRET, L., COULOMB, B., LAPIERE, C., NUSGENS, B. et NEVEUX, Y. (1983). The reconstitution of living skin. J. Invest. Dermatol., 81, 2s-10s.

BERTHOD, F., GERMAIN, L., GUIGNARD, R., LETHIAS, C., GARRONE, R., DAMOUR, O., van der REST, M. et AUGER, F.A. (1997). Differential expression of collagens XII and XIV in human skin and in reconstructed skin. J. Invest. Dermatol., 108, 737-742.

BETTELHEIM, F.A. et PLESSY, B. (1975). The hydratation of proteoglycans of bovine cornea. Biochem. Biophys. Acta, 381, 203-214.

BLANK, I.H. (1952). Factors which influence the water content of the *stratum corneum*. J. Invest. Dermatol., 18, 433-440.

BONDOC, C.C. (1971). Clinical experience with viable frozen human skin and a frozen skin bank. Ann. Surg., 174, 371.

BOUVARD, V., GERMAIN, L., ROMPRÉ, P., ROY, B. et AUGER, F.A. (1992). Influence of dermal equivalent on the development of a cultured skin equivalent. Biochem. Cell Biol., 70, 34-42.

BRODLAND, G.W. (1988). Highly non-linear deformation of uniformly-loaded circular plates. Int. J. Sol. Struc., 24, 351-362.

BROWN, I.A. (1973). A scanning electron microscope study of the effects of uniaxial tension on human skin. Br. J. Dermatol., 89, 383-393.

BURGESON, R.E. (1982). Genetic heterogeneity of collagens. J. Invest. Dermatol., 79, 255-305.

BURLIN, T.E., HUTTON, W.C. et RANU, H.S. (1977). A method of *in vivo* measurement of the elastic properties of skin in radiotherapy patients. J. Invest. Dermatol., 69, 321-323.

BUSCHMANN, M.D. et GRODZINSKY, A.J. (1995). A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. J. Biomech. Eng., 117, 179-192.

BUTLER, D.L., GROOD, E.S., NOYES, F.R. et ZERNICKE, R.F. (1978). Biomechanics of ligaments and tendons. Exercices and sports science review. R. Hutton. Franklin Institute Press, 6, 125-181.

CHAPUIS, J.F. et AGACHE, P. (1992). A new technique to study the mechanical properties of collagen lattices. J. Biomech, 25, 115-120.

CHIEN, J.C.W. et CHANG, E.P. (1973). Influence of telopeptide on the morphology and physicomechanical properties of reconstitued collagen. Biopolymers, 12, 2045-2055.

CHOI, H.S et VITO, R.P. (1990). Two-dimensional stress-strain relationship for canine *pericardium*. J. Biomech. Eng., 112, 153-159.

CHRISTENSEN, M.S., HARGENS III, C.W., NACHT, S.et GANS, E.H. (1977). Viscoelastic properties of intact human skin: Instrumentation, hydratation effects, and contribution of the *stratum corneum*. J. Invest. Dermatol., 69, 282-286.

CHVAPIL, M., CHVAPIL, T.A. et OWEN, J.A. (1987). Comparative study of four wound dressing on epithelialization of partial-thickness wounds in pigs J. Trauma, 27, 278-282.

CLARK, J.A., CHENG, J.C.Y., LEUNG, K.S. et LEUNG, P.C. (1987). Mechanical characterisation of human postburn hypertrophic skin during pressure therapy. J. Biomech., 20, 397-406.

CLUNGSTIN, P.A., SNELLING, C.F.T. et MACDONALD, I.B. (1992). Cultured epithelial autografts; three years of clinical experience with eighteen patients. J. Burn. Rehab., 13, 174-180.

COMAISH, S. et BOTTOMS, E. (1971). The skin and friction: deviations from Amontons'laws and the effects of hydratation and lubrication. Br. J. Dermatol., 84, 37-43.

COMNINOU, M. et YANNAS, I.V. (1976). Dependance of stress-strain nonlinearity of connective tissue on the geometry of collagen fibres. J. Biomech., 9, 427-433.

COMPER, W.D. et LAURENT, T.C. (1978). Physiological function of connective tissue polysaccharides. Physiol. Rev., 58, 253-315.

COMPTON, C.C., GILL, J.M., BRADFORD, D.A., REGANER, S., GALLICO III, G.G. et O'CONNER, N.E. (1989). Skin regenerated from cultured epithelial autogragt on full thickness burn wounds from 6 day to 5 years after gragting. Lab. Invest., 60, 600-612.

COOK, T., ALEXANDER, H. et COHEN, M. (1977). Experimental method for determining the 2-dimensional mechanical properties of living human skin. Med. Biol. Eng. Comput., 15, 381-390.

COOPER, J.H. (1969). Histochemical observations on the elastic sheath: elastofibril system of the dermis. J. Invest. Dermatol., 52, 169-176.

COOPER, J.H. et HANSBROUGH, J.F. (1991). Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen-GAG matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice. Surgery, 109, 198-207.

COULOMB, B., LEBRETON, C. et DUBERTRET, L. (1989). Influence of human dermal fibroblasts on epidemalization. J. Invest. Dermatol., 92, 122-125.

CRENSHAW, R.P. et VISTNES, L.M. (1989). A decade of pressure sore research: 1977-87. J. Rehabil. Res. Dev., 26, 63-74.

CRENSHAW, R.P. et VISTNES, L.M. (1989). A decade of pressure sore research: 1977-87. J. Rehabil. Res. Dev., 26, 63-74.

CUA, A.B., WILHELM, K.P. et MAIBACH, H.I. (1990). Elastic properties human skin: Relation to age, sex and anatomical region. Arch. Dermatol. Res., 282, 283-288.

CUSACK, S. et MILLER, A. (1979). Determination of the elastic constants of collagen by Brillouin light scattering. J. Mol. Biol., 135, 39-51.

DALY, C.H. (1969). The role of elastin in the mechanical behavior of human skin. digest 8th I.C.M.B.E. Chicago IL, 7.

DALY, C.H. (1982). Biomechanical properties of the dermis. J. Invest. Dermatol., 79, 17s-20s.

DALY, C.H. et ODLAND, G.F. (1979). Age-related changes in the mechanical properties of human skin. J. Invest. Dermatol., 73, 84-87.

DANIEL, R.K., PRIEST, D.L. et WHEATLEY, D.C. (1981). Etiology factors in pressure sores: an experimental model. Arch. Phys. Med. Rehabil., 62, 492-498.

DANIELSEN, C.C. (1981). Mechanical properties of reconstituted collagen fibrils: A study on reconstitution methodology and influence of *in vitro* maturation. , 51-57.

DANS, M.J. et ISSEROFF, R. (1994). Inhibition of collagen lattice contraction by pentoxifylline and interferron-alpha, -beta, and -gamma. J. Invest. Dermatol., 102, 118-121.

de RIGAL, J. et LÉVÊQUE, J.L. (1985). In vivo measurment of the stratum corneum elasticity. Bioeng. Skin, 1, 13-23.

DECREAMER, W.F., MAES, M.A. et VANHUYSE, V.J. (1980a). An elastic stress-strain relation for soft biological tissue based on a structural model. J. Biomech., 13, 463-468.

DECREAMER, W.F., MAES, M.A., VANHUYSE, V.J et VANPERERSTRAETE, P. (1980b). A non-linear viscoelastic constitutive equation for soft biological tissues, based upon a structural model", J. Biomech., 13, 559-564.

DELVOYE, P., WILIQUET, P., LEVÊQUE, J.-L., NUSGENS, B.V. et LAPIÈRE, C.M. (1991). Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensionnal collagen gel. J. Invest. Dermatol., 97, 898-902.

DEMLING, R.H. (1985). Burns. New Engl. J. Med., 313, 1389-1398.

DICK, J.C. (1951). Tension and resistance to stretching of human skin and other membranes. J. Physiol., 112, 102-113.

DICKINSON, R.B., GUIDO, S. et TRANQUILLO, R.T. (1994). Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. Annals. Biomed. Eng., 22, 342-356.

DINSDALE, S.M. (1974). Decubitus ulcer: role of pressure and friction in causation. Arch. Phys. Med. Rehabil., 55, 147-152.

DONG, C., MEAD, E., SKALAK, R., FUNG, Y.C., DEBES, J.C., ZAPATA-SIRVENT, R.L., ANDREE, C., GREENLEAF, G. COOPER, M. et HANSBROUGH, J.F. (1993). Development of a device for measuring adherance of skin grafts to the wound surface. Annals. Biomed. Eng., 21, 51-55.

DORE, M. et LAFRANCE, H. (1989). Organe dermo-épidermique. Projet sous-gradué, Université Laval, 1-53.

DORE, M. et LAFRANCE, H. (1989). Appareil de mesure des propriétés mécaniques de peau *in vitro*. Projet sous-gradué, Université Laval, 1-53.

DORLOT, J.-M., BAÎLLON, J.-P. et MASOUNAVE, J. (1986). Des matériaux. Éditions de l'École Polytechnique de Montréal.

DUBERTRET, L. et COULOMB, B. (1995). Organogénèse cutanée *in vitro*. Bull. Acad. Natle. Méd., 179, 1121-1133.

DUBERTRET, L., COULOMB, B., SAIAG, P et TOURAINE, R. (1987). Les peaux artificielles vivantes. La Recherche, 18, 148-159.

DUNN, J.C.Y., TOMPKINS, R.G. et YARMUSH, M.L. (1991). Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagne sandwich configuration. Biotech. Prog., 7, 237-245.

DUPUYTREN, G. (1834). Traité théorique et pratique des blessures par armes de guerre. Maison, Paris, 1, 66.

EDWARDS, C. et MARKS, R. (1995). Evaluation of biomechanical properties of human skin. Clin. Dermatol., 13, 375-380.

EHRMANN, R.L. et GEY, G.O. (1956). The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. J. Natl. Cancer Institute, 16, 1375-1390.

ELIAS, P.M. (1983). Epidermal lipids, barrier function and desquamation. J. Invest. Dermatol., 80, 44s-49s.

ELLIS, D.L. et YANNAS, I.V. (1996). Recent advances in tissue synthesis *in vivo* by use of collagen-glycosaminoglycan copolymer. Biomaterials, 17, 291-299.

ELSDALE, T.R. et BARD, J.B.L. (1972). Collagen substrata for studies of cell behavior. J. Cell Biol., 41, 298-311.

EMERY, J.L., OMENS, J.H. et MCCULLOCH, A.D. (1997). Strain softening in rat left ventricular myocardium. J. Biomech. Eng., 119, 6-12.

EPSTEIN, E.H. (1974). Alpha 1 (III) 3 human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. J. Biol. Chem., 249, 3225-3231.

ESCOFFIER, C., de RIGAL, J., ROCHEFORT, A, VASSELET, R., LÉVÊQUE, J.-L. et AGACHE, P.G. (1989). Age-related mechanical properties of human skin: an *in vivo* study. J. Invest. Dermatol., 93, 353-357.

FERGUSON-PELL, M. (1997). The pressure's on- clinical application of pressure mapping. 13th Intl. Seating Symp. Pittsburgh, 104.

FERGUSON-PELL, M., SPRIGLE, S., DAVIS, K. et HAGISAWA, S. (1997). Detecting incipient pressure sore onset. 13th Intl. Seating Symp. Pittsburgh, 357-366.

FINLAY, B. (1969). Scanning electron microscopy of the human dermis under uni-axial strain. Bio-Med. Eng., 4, 322-327.

FINLAY, B. (1970). Dynamic mechanical testing of human skin *in vivo*. J. Biomech., 3, 557-568.

FLEISCHMAJER, R., OLSEN, B.R., TIMPL, R., PERLISH, J.S. et LOVELACE, O. (1983). Collagen fibril formation during embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3354-3358.

FLORY, P.J. (1976). Spatial configuration of macromolecules chains. Polymer science: achievements and prospects, H. Markovitz, E.F. Casassa, John Wiley & Sons, N.Y, 19-37.

FLÜGGE, W. (1975). Viscoelasticity. Springer-Verlag, N.Y., 22-23.

FRANCIS, A.J. et MARKS, R. (1977). Factors responsible for dermally induced epidermal hyperplasia. Arch. Dermatol. Res., 258, 275-280.

FRISÉN, M., MÄGI, M., SONNERUP, L. et VIIDIK, A. (1969). Rheological analysis of soft collagenous tissue. J. Biomech, 2, 21-28.

FUCHS, E. (1990). Epidermal Differentiation: the Bare Essentials. J. Cell Biol., 111, 2807-2814.

FUCHS, E. (1990). Epidermal differentiation: the bare essentials. J. Cell Biol., 111, 2807-2814.

FUNG, Y.C. (1967). Elasticity of soft tissues in simple elongation. Am. J. Physiol., 213, 1532-1544.

FUNG, Y.C. (1969). A first course in continuum mechanics. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 1-111.

FUNG, Y.C. (1972). Stress-strain-history relations of soft tissues in simple elongation. Biomechanics: Its foundations and objectives. Y.C. Fung, N. Perrone, M. Anliker, Prentice-Hall, N.J., 181-208.

FUNG, Y.C. (1990). Biomechanics: Motion, flow, stress, and growth. Springer-Verlag, N.Y.

FUNG, Y.C. (1993). Biomechanics: mechanical properties of living tissues. Springer-Verlag, NY., 243-320.

FUNG, Y.C., LIU, S.Q. et ZHOU, J.B. (1993). Remodeling of the constitutive equation while a blood vessel remodels itself under stress. J. Biomech. Eng., 115, 453-459.

GALLICO III, G.G. (1990). Biologic skin substitutes. Clin. Plast. Surg., 17, 519-526.

GALLICO III, G.G., O'CONNER, N.E., COMPTON, C., KEHINDE, O. et GREEN, H. (1984). Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human eptithelium. N. Engl. J. Med., 311, 448-451.

GERMAIN, L. et AUGER, F.A. (1995). Tissue engineered biomaterials: Biological and mechanical characteristics. Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering. D.L. Wise, D.J. Trantolo, D.E. Altobelli, M.J. Yaszemski, J.D. Gresser, E.R. Schwartz, Marcel Dekker Inc., N.Y., 699-733.

GERMAIN, L., JEAN, A., AUGER, F.A. et GARREL (1994). Human wound healing fibroblast have greater contractile propoperties than dermal fibroblast. J. Surg. Res. 57, 268-273.

GERMAIN, L., ROUABHIA, M., GUIGNARD, R., CARRIER, L., BOUVARD, V. et AUGER, F.A. (1993). Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. Burns, 19, 99-104.

GIBSON, T., KENEDI, R.M. et CRAIK, J.E. (1965). The mobile achitecture of dermal collagen. Br. J. Surg., 52, 764-770.

GIBSON, T., STARK, H. et EVANS, J.H. (1969). Directional variation in extensibility of human skin *in vivo*. J. Biomech., 2, 201-204.

GOLDSMITH (1990). My organ is bigge than your organ. Arch. Dermatol., 126, 301-302.

GOULET, F., POITRAS, A., ROUABHIA, M., CUSSON, D., GERMAIN, L. et AUGER, F.A. (1996). Stimulation of human keratinocyte proliferation through growth factor exchanges with dermal fibroblasts *in vitro*. Burns, 22, 107-112.

GRACE, A. (1992). Optimization toolbox for use with Matlab®. The Math Works Inc., MA, 2.22-2.31.

GRAHAME, R. (1970). A method for measuring human skin elasticity *in vivo* with observations on the effects of age, sex and pregnancy. Clin. Sci., 39, 223.

GRANT, M.E. et PROCKOP, D.J. (1972). The biosynthesis of collagen. N. Engl. J. Med., 286, 272.

GREEN, H., KEHINDE, O. et THOMAS, J. (1979). Growth cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc. natl. Acad. Sci. USA, 76, 5665-5668.

GRINNELL, F.G et LAMKE, C.R. (1984). Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. J. Cell. Sci., 66, 51-63.

GRINNELL, F.G. (1994). Fibroblasts, myofibroblasts, and woud contraction. J. Cell. Biol., 124, 401-404.

GRINNELL, F.G. et LAMKE, C.R. (1984). Reorganization of Hydrated Collagen Lattices by Human Skin Fibroblasts. J. Cell. Sci., 66, 51-63.

GUIDO, S. et TRANQUILLO, R.T. (1993). A methodology for the systematic and quantitative study of cell contact guidance in oriented collagen gels. J. Cell. Sci., 105, 317-331.

GUIDRY, C. et GRINNELL, F.G. (1985). Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. J. Cell. Sci., 79, 67-81.

GUIDRY, C. et GRINNELL, F.G. (1986). Contraction of hydrated collagen gels by fibroblasts: evidence for two mechanisms by which collagen fibrils are stabilized. Collagen Rel. Res., 6, 515-529.

GUIDRY, C. et GRINNELL, F.G. (1987). Heparin Modulates the Organization of Hydrated Collagen Gels and Inhibits Gel Contraction by Fibroblasts. J. Cell. Biol., 104, 1097-1103.

GUIDRY, C. et GRINNELL, F.G. (1987). Heparin modulates the organization of hydrated collagne gels and inhibits gel contraction by fibroblasts. J. Cell. Biol., 104, 1097-1103.

HADDOW, J.B., WEGNER, J.L. et JIANG, L. (1992). An Approach to Finite Static Axially Symmetric Deformation of a Hyperelastic Membrane. Acta Mechanica, 92, 77-90.

HARLEY, R., JAMES, D., MILLER, A. et WHITE, J.W. (1977). Phonons and the elasctic *moduli* of collagen and muscle. Nature, 267, 285-287.

HARRIS, A.K., STOPAK, D. et WARNER, P. (1984). Generation of spatially periodic patterns by a mechanical instability: a mechanical alternative to the turning model. J. Embryol. Exp. Morphol., 80, 1-20.

HARRIS, A.K., STOPAK, D. et WILD P. (1981). Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. Nature, 290, 249-251.

HELM, P.A. (1992). Burn rehabilitation: dimensions of the problem. Clin. Plast. Surg., 19, 551-559.

HIGHLEY, D.R., COOMEY, M., DENBESTE, M. et WOLFRAM, L.J. (1977). Frictional properties of skin. J. Invest. Dermatol., 69, 303-305.

HOFMANN, H., VOSS, T., KUHN,K et ENGEL, J. (1983). Localization of flexible sites in thread-like molecules from electron micrographs-Comparison of interstitial, basement membrane and *intima* collagen. J. Mol. Biol., 172, 325-343.

HOLBROOK, K.A. (1991). Structure and function of the developing human skin. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, L.A. Godldsmith, Oxford University Press, N.Y., Chapitre 1.

HOLBROOK, K.A. et BYERS, P.H. (1981). Ultrastructural characteristics of the skin in a form of the Ehlers-Danlos syndrome type IV: storage in the rough endoplasmic reticulum. Lab. Invest., 44, 342-350.

HOROWITZ, A., LANIR, Y., YIN, F.C.P., PERL, M., SHEINMAN, I. et STRUMPF, R.K. (1988). Structural three-dimensional constitutive law for the passive myocardium. J. Biomech. Eng., 110, 200-207.

HSU, S., JAMIESON, A.M. et BLACKWELL, J. (1994). Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. Biorheology, 31, 21-36.

HSU, S.H. (1992). The role of viscoelasticity and the sol-gel transition in the physiological function of biological fluids. Thèse de doctorat, Case Western Reserve University, U.S.A.

HUANG, D., CHANG, T.R., AGGARWAL, A., LEE, R.C. et EHRLICH, H.P. (1993). Mechanisms and dynamics of mechanical strengthening in ligament-equivalent fibroblast populated collagen matrices. Annals. Biomed. Eng., 21, 289-305.

HULL, B.E., FINLEY, R.K. et MILLER, S.F. (1990). Coverage of full-thickness burns with bilayered skin equivalents: a preliminary clinical trial. Surgery, 107, 496-502.

HULMES, D.J.S. et MILLER, A. (1979). Quasi-hexagonal molecular packing in collagen fibrils. Nature, 282, 878-880.

HUMPHREY, J.D., VAWTER, D.L. et VITO, R.P. (1987). Quantification of strains in biaxially tested soft tissues. J. Biomech., 20, 59-65.

HUNTER, J.A.A. et FINLAY, B. (1973). Scanning electron microscopy of connective tissues in health and disease. Int. Rev. Conn. Tiss. Rev., 6, 217-255.

JAMISON, C.E., MARANGONI, R.D. et GLASER, A.A. (1968). Viscoelastic properties of soft tissue by discrete model characterization. J. Biomech., 1, 33-46.

JEMEC, G.B.E., JEMEC, B., B.I.E., JEMEC et SERUP, J. (1990). The effect of superficial hydratation on the mechanical properties of human skin *in vivo*: Implications for plastic surgery. Plast. Reconstr. Surg., 85, 100-103.

JENKINS, R.B. et LITTLE, R.W. (1974). A constitutive equation for parallel-fibered elastic tissue. J. Biomech., 7, 397-402.

JOHNSON, G.A., LIVESAY, G.A., WOO, S.L.-Y. et RAJAGOPAL, K.R. (1996). A single integral finite strain viscoelastic model of ligaments and tendons. J. Biomech. Eng., 118, 221-226.

JOHNSON, M.A. et BEATTY, M.F. (1995). The Mullins effect in equibiaxial extension and its influence on the inflation of a balloon. Int. J. Eng. Sci., 33, 223-245.

JØRGENSEN, P.H., BANG, C. et ANDREASSEN, T.T. (1993). Mechanical properties of skin graft wounds. Br. J. Plastic Surg., 46, 565-569.

KADLER, K.E. (1994). Extracellular matrix 1: Fibril-forming collagens. Protein Profile, 1, 519-638.

KADLER, K.E., HOJIMA, Y. et PROCKOP, D.J. (1987). Assembly of collagen fibrils *de novo* by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen C-proteinase. J. Biol. Chem., 260, 15696-15701.

KADLER, K.E., HULMES, D.J., HOJIMA, Y. et PROCKOP, D.J. (1990). Assembly of type I collagen fibrils *de novo* by the specific enzymic cleavage of pC collagen. The fibrils formed at about 37°C are similar in diameter, roundness, and apparent flexibility to the collagne fibrils seen in connective tissue. Ann. N.Y. Acas. Sci., 580, 214-224.

KAFKA, V. (1996). Communication personnelle de V. Kafka, professeur, Academy of Sciences of the Czech Republic.

KARLSSON, J.O.M. et TONER, M. (1995). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials, 17, 243-256.

KAS'YANOV, V.A. et MUNGALOV, D.D. (1984). Hybrid composite material model for soft biological tissue at high strains. Mekanika Kompozitnykh Materialov, 6, 1065-1071.

KASTELLIC, J., PALLEY, I. et BAER (1980). A structural mechanical model for tendon crimping. J. Biomech., 13, 887-893.

KENEDI, R.M., GIBSON, T., DALY, C.H. et ABRAHAMS, M. (1966). Biomechanical characteristics of human skin and costal cartilage. Fed. Pro.-Lubrication and Biomech., 25, 1084-1087.

KENEDI, R.M., GIBSON, T., EVANS, J.H. et BARBENEL, J.C. (1975). Tissue Mechanics. Phys. Med. Biol., 20, 699-717.

KOLODNEY, M.S. et WYSOLMERSKI, R.B. (1992). Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue cultre: a quantitative study. J. Cell. Biol., 117, 73-82.

KOSIAK, M. (1959). Etiology and pathophysiology of decubitus ulcer. Arch. Phys. Med. Rhabil., 40, 79-80.

KOSIAK, M. (1974). Etiology and pathophysiology of decubitus ulcer. Arch. Phys. Med. Rehabil., 40, 79-80.

KOUTROUPI, K.S. et BARBENEL, J.C. (1990). Mechanical and failure behavior of the *stratum corneum*. J. Biomech., 23, 281-287.

KOVACH, I.S. (1995). The importance of polycaccharide configurational entropy in determining the osmotic swelling pressure of concentrated proteoglycan solution and the bulk compressive modulus of articulage cartilage. Biophys. Chem., 53, 181-187.

KSANDER, G.A., VISTNES, L.M. et ROSE, E.H. (1977). Excisional wound biomechanics, skin tension lines and elastic contraction. Plast. Reconstr. Surg., 59, 398-406.

KWAN, M.K. et WOO, S.L.-Y. (1989). A structural model to describe the nonlinear stress-strain behavior for parallel-fibered collagenous tissues. J. Biomech. Eng., 111, 361-363.

L'HEUREUX, N., GERMAIN, L., LABBÉ, R. et AUGER, F.A. (1993). *In vitro* construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: a morphologic study. J. Vasc. Surg., 17, 499-509.

L'HEUREUX, N., PÂQUET, S., LABBÉ, R., GERMAIN, L. et AUGER, F.A. A tissue engineered human blood vessel. (Soumis à Nature Medicine).

LANGER, K. (1861). On the anatomy and physiology of the skin. I. The cleavability of the cutis, T. Gibson, Br. J. Plas. Surg., 31, 3-8.

LANGER, K. (1862a). On the anatomy and physiology of the skin. II. Skin tension, T. Gibson, Br. J. Plas. Surg., 31, 93-106.

LANGER, K. (1862b). On the anatomy and physiology of the skin. III. The elasticity of the cutis, T. Gibson, Br. J. Plas. Surg., 31, 185-199.

LANGER, R. et VACANTI, J.P. (1993). Tissue engineering. Science, 260, 920-925.

LANGER, R. et VACANTI, J.P. (1995). Artificial organs. Scientific Am., 273, 130-133.

LANIR, Y. (1976). Biaxial stress-relaxation in skin. Ann. Biomed. Eng., 4, 250-270.

LANIR, Y. (1979a). A structural theory for the homogeneous biaxial stress-strain relationships in flat collageneous tissues. J. Biomech., 12, 423-436.

LANIR, Y. (1979b). The rheological behavior of the skin: experimental results and a structural model. Biorheology, 16, 191-202.

LANIR, Y. (1983). Constitutive equation for fibrous connective tissues. J. Biomech., 16, 1-12.

LANIR, Y. (1987). Biorheology and fluid flux in swelling tissues. I. Bicomponent theory for small deformations, including concentration effects. Biorheology, 24, 173-187.

LANIR, Y. (1987). Skin mechanics. Handbook of bioengineering. R. Skalak, S. Chien, McGraw-Hill, N.Y., 11.1-11.25.

LANIR, Y. (1988). Physico-chemical and microstructural changes in collagen fiber bundles following stretch *in vitro*. Biorheology, 25, 591-603.

LANIR, Y. (1994). Plausibility of structural constitutive equations for isotropic soft tissues in finite static deformations. J. Appl. Mech., 61, 695-702.

LANIR, Y. (1996). Plausibility of structural constitutive equations for swelling tissues—Implications of the C-N and S-E conditions. J. Biomech. Eng., 118, 10-16.

LANIR, Y. et FUNG, Y.C. (1974a). Two-dimensional mechanical properties of rabbit-skin II: Experimentals systems. J. Biomech., 7, 29-34.

LANIR, Y. et FUNG, Y.C. (1974b). Two-dimensional mechanical properties of rabbit-skin II: Experimentals results. J. Biomech., 7, 171-182.

LANIR, Y., DIKSTEIN, S., HARTZSHTARK, A. et MANNY, V. (1990). *In-vivo* indentation response of human skin. J. Biomech. Eng., 112, 63-67.

LANIR, Y., MANNY, V., ZLOTOGORSKI, A., SHAFRAN, A. et DICKSTEIN, S. (1993). Influence of ageing on the in vivo mechanics of skin. Skin Pharmacol., 6, 223-230.

LAPIÈRE, Ch.M. et NUSGENS, B.V. (1974). Polymerization of procollagen *in vitro*. Biochem. Biophys. Acta, 342, 237-246.

LAPIÈRE, Ch.M., NUSGENS, B.V. et PIÉRARD, G.E. (1977). Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. Conn. Tissue Res., 5, 21-29.

LAPIÈRE, Ch.M., NUSGENS, B.V. et PIÉRARD, G.E. (1988). The architectural organization and function of the macromolecules in the dermis. The physical nature of the skin, R.M. Marks, S.P. Barton et C. Edwards, MTP Press Limited, U.K., 163-175.

LARRABEE, W.F. (1986). A finite element model of skin deformation. I. Biomechanics of skin and soft tissue: a review. Laryngoscope, 96, 399-405.

LÉVÊQUE, J.-L. et RASSENEUR, L. (1988). Mechanical properties of *stratum corneum*: influence of water and lipids. The physical nature of the skin, R.M. Marks, S.P. Barton et C. Edwards, MTP Press Limited, U.K., 7 pages.

LÉVÊQUE, J.-L. POELMAN, M.C., de RIGAL, J. et KLIGMAN, A.M. (1988). Are corneocytes elastic? Dermatologica, 176, 65-69.

LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S.L. MATSUDAIRA, P. et DARNELL, J. (1995). Molecular cell biology. Scientific American Book, N.Y., 991-1200.

LÓPEZ VALLE, C.A., AUGER, F.A., ROMPRÉ, P., BOUVARD, V. et GERMAIN, L. (1992). Peripheral anchorage of dermal equivalents. Br. J. Dermatol., 127, 365-371.

LÓPEZ VALLE, C.A., GERMAIN, L., ROUABHIA, M., XU, W., GUIGNARD, R., GOULET, F. et AUGER, F.A. (1996). Permanent Grafting of Living Skin Substitutes: Surgical Parameters to Control for Successful Results. Transplantation, 62, 317-323.

LORBER, M. et MILOBSKY, S.A. (1968). Stretching of the skin in vivo. A method of influencing cell division and migration in the rat epidermis. J. Invest. Dermatol., 51, 395-402.

MADRI, J.A. et PRATT, B.P. (1986). Endothelial cell-matrix interactions: *in vitro* models of angiogenesis. J. Hisotchem. Cytochem., 34, 85.

MANSCHOT, J.F.M. et BRAKKEE, A.J.M. (1986). The measurement and modelling of the mechanical properties of human skin *in vivo*- I. The measurement. J. Biomech., 19, 511-515.

MANSOUR, J.M., DAVIS, B.R., SROUR, M. et THEBERGE, R. (1993). A method for obtaining repeatable measurements of the tensile properties of skin at low strain. J. Biomech., 26, 211-216.

MARGOLIS, D.J. (1995). Definition of a pressure ulcer. Ad. Wound Care, 8, 28.8-28.10.

MARGOLIS, D.J. et LEWIS, V.L. (1995). A litterature assessment of the use of miscellaneous topical agents, growth factors, and skin equivalents for the treatment of pressure ulcers. Dermatol. Surg., 21, 145-148.

MARIEB, E.N. et LAURENDEAU, G. (1992). Anatomie et Physiologie humaines, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 138-156.

MARKENSCOFF, X. et YANNAS, I.V. (1979). On the stress-strain relation for skin. J. Biomech., 12, 127-129.

MARKS, R. (1991). Mechanical properties of the skin. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, L.A. Godldsmith, Oxford University Press, N.Y., 602-621.

MARTIN, J.E., DOUGLAS, A. et WILCOXON, J.P. (1989). Viscoelasticity near the sol-gel transition. Phys. Rev. A, 39, 1325-1332.

MATLHOKO, A. (1994). Surface tension. Nursing Times, 90, 61-67.

MATSUZAKI, K., KUMAGAI, N., FUKUSHI, S. OHSHIMA, H., TANABE, M. et ISHIDA, H. (1995). Cultured epithelial autografting on meshed skin graft scars: evaluation of skin elasticity.J. Burn Care Rehabil., 16, 496-502.

McCRUM, N.G., BUCKLEY, C.P. et BUCKNALL, C.B. (1990). Principles of polymers engineering. Oxford University press, NY, 50-62, 72-100.

MICHEL, M. (1995). Caractérisation de différentes populations de kératinocytes et influence de leur phénotype sur l'activité fonctionnelle des équivalents dermo-épidermiques produits *in vitro*. Thèse de doctorat, Université Laval, 1-201.

MICHEL, M., AUGER, F.A. et GERMAIN, L. (1993). Anchored skin equivalent cultured in vitro: a new tool for percutaneous absorption studies. In Vitro Cell. Dev. Biol., 29A, 834-837.

MICHEL, M., GERMAIN, L., BÉLANGER, P.M. et AUGER, F.A. (1995). Functional evaluation of anchored skin equivalent cultured invitro: percutaneous absorption studies and lipid analysis. Pharmaceut. Res., 12, 455-458.

MICHEL, M., L'HEUREUX, N., GERMAIN, L. et AUGER, F.A. (1997). From Newborn to Adult: Phenotypic an Functional Properties of Skin Equivalent and Human Skin as a Function of Donor Age. J. Cell. Physiol., 17, 179-189.

MIDDLETON, J.D. (1968). The mechanism of water binding in *stratum corneum*. Br. J. Dermatol., 80, 437-450.

MILLINGTON, P.F. et WILKINSON, R. (1983). Skin: biological structure and function. Cambridge University Press, U.K.

MIYAHARA, M., YAYASHI, K., BERGER,J., TANZAWA, K., NJIEHA, F.,TRELSTAD, R.L. et PROCKOP, D.J. (1984). Formation of collagen fibrils by enzyme cleavage of precurors of type I collagen *in vitro*. J. Biol. Chem., 259, 9891-9898.

MONTAGNA, W. et PARAKKAL, P.F. (1974). The structure and function of skin. Academic Press Inc., N.Y.

MOON, A.G. et TRANQUILLO, R.T. (1993). Fibroblast-populated collagen microsphere assay of cell traction force: Part 1. Continuum model. AIChE J., 39, 163-177.

MOSHER, D.F. et FURCHT, L.T. (1981). Fibronectin: review of its structure and possible functions. J. Invest. Dermatol., 77, 175-180.

MRIDHA, M., ÖDMAN, S. et AKE ÖBEG, P. (1992). Mechanical pulse wave propagation in gel, normal and oedematous tissues. J. Biomech., 25 1213-1218.

NAYLOR (1955). The skin surface and friction. Br. J. Dermatol., 67, 239-248.

NEREM, R.M. et SAMBANIS, A. (1995). Tissue engineering: from biology to biological substitutes. Tiss. Eng., 1, 3-13.

NESTLER, F.H.M., HVIDT, S. et FERRY, J.D. (1983). Flexibility of collagen determined from dilute solution viscoelastic measurements. Biopolymers., 22, 1747-1758.

NGUYEN, A.L., VU, B.T. et WILKES, G.L. (1974). The dynamic mechanical dielectric, an melting behavior of reconstituted collagen. Biopolymers., 13, 1023-1037.

NIKKELS-TASSOUDJI, N., HENRY, F., LETAWE, C., PIÉRARD-FRANCHIMONT, C., LEFÈBRE, P. et PIÉRARD, G.E. (1996). Mechanical properties of the diabetic waxy skin. Dermatology., 192, 19-22.

NOLA, G.T. et VISTNES, L.M. (1980). Differential response of skin and muscle in the experimental production of pressure sores. Plast. Reconstr. Surg., 11, 728-733.

NORTH, J.F. et GIBSON, F. (1978). Volume compressibility of human abdominal skin. J. Biomech., 11, 203-205.

NOTBOHM, H., MOSLER, S., MÜLLER, P.K. et BRINCKMANN, J. (1993). *In vitro* formation and aggregation of heterotypic collagen I and III fibrils. Int. J. Biol. Macromol., 15, 299-304.

NUSGENS, B., MERRILL, C., LAPIÈRE, Ch.M. et BELL, E. (1984). Collagen biosynthesis by cells in a tissue equivalent matrix *in vitro*. Coll. Rel. Res., 4, 351-364.

OSTER, G.F., MURRAY, J.D. et HARRIS, A.K. (1983). Mechanical aspects of mesenchymal morphogenesis. J. Embryol. Exp. Morph., 78, 83-125.

OVERGAARD OLSEN, L. et JEMEC, G.B.E. (1993). The influence of water, glycerin, parffin oil, ethanol on skin mechanics. Acta Derm. Venerol., 73, 404-406.

OXLUND, H., MANSCHOTT, J. et VIIDIK, A. (1988). The role of elastin in the mechanical properties of skin. J. Biomech., 21, 213-218.

PARK, A.C. et BADDIEL, C.D. (1972). Rheology of *stratum corneum*-II: A physico-chemical investigation of factors influencing the water content of the *corneum*. J. Soc. Cosmet. Chem., 23, 13-21.

PARKINSON, J., BRASS, A., CANOVA, G. et BRECHET, Y. (1997). The mechanical properties of simulated collagen fibrils. J. Biomech., 30, 549-554.

PARKINSON, J., KADLER, K.E. et BRASS, A. (1995). Simple physical model of collagen fibrillogenesis based on diffusion limited aggregation. J. Mol. Biol., 247, 823-831.

PARRY, D.A.D. (1988). The molecular and fibrillar structure of collagne and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. Biophys. Chem., 29, 195-209.

PEREIRA, J.M., MANSOUR, J.M. et DAVIS, B.R. (1991a). The effects of layer properties on shear disturbance propagation in skin. J. Biomech. Eng., 113, 30-35.

PEREIRA, J.M., MANSOUR, J.M. et DAVIS, B.R. (1991b). Dynamic measurement of the viscoelastic properties of skin. J. Biomech., 24, 157-162.

PHILLIPS, T.J. (1994). Chronic cutaneous ulcers: etiology and epidemiology. J. Invest. Dermatol., 102, 38s-41s.

PIÉRARD, G.E. (1983). Syndrome d'Ascher et Cutis Laxa. Ann. Derm. Vener., 110, 237-240.

PIÉRARD, G.E., LETAWE, C., DOWLATI, A. et PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. (1995). Effect of hormone replacement therapy for menopause on the mechanical properties of skin. J. Am. Geriatr. Soc., 43, 662-665.

PIÉRARD, G.E., NIKKELS-TASSOUDJI, N. et PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. (1995). Influence of the test area on the mechanical properties of skin. Dermatology, 191, 9-15.

PIÉRARD, G.E., PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. et LAPIÈRE, Ch.M. (1983). Histopathological aid at the diagnosis of the Ehlers-Danlos syndrome, gravis and mitis types. Int. J. Dermatol., 22, 300-304.

PIEZ, K.A. (1982). Structure and assembly of the native collagen fibril. Conn. Tiss. Res., 10, 25-36.

PISKOUNOV, N. (1980). Calcul différentiel et intégral I. Éditions MIR, Moscou, 290.

PITTLEKOW, M.R., COLLEY Jr., R.J. et MOSES, H.L. (1991). Transforming growth factor-β and other growth factors. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, L.A. Godldsmith, Oxford University Press, N.Y., 375.

PROCKOP, D.J., KIVIRIKKO, K.I., TUDERMAN, L. et GUZMAN, N.A. (1979). The biosynthesis of collagne and its disorders. N. Engl. J. Med., 301, 13-23.

QUIRINIA, A. et VIIDIK, A. (1991). Freezing for postmortal storage influences the biomechanical properties of linear skin wounds. J. biomech., 24, 819-823.

RAGNELL, A. (1954). The tensibility of the skin: an experimental investigation. Plas. Reconstr. Surg., 14, 317-323.

RASSENEUR, L., de RIGAL, J. et LÉVÊQUE, J.L. (1982). Influence des différents constituants de la couche cornée sur la mesure de son élasticité. Int. J. Cosmet.Sci., 4, 247-260.

RATNER, B.D. (1993). New ideas in biomaterials science- a path to engineered biomaterials. J. Biomat. Mater. Res., 27, 8837-8850.

REES, J.M. et DIMICK, A.R. (1992). The cost of burn care and the federal government's response in the 1990's. Clin. Plast. Surg., 19, 561-568.

REID, G.G., LACKIE, J.M. et GORHAM, S.D. (1990). The behaviour of BHK cells and neutrophil leukocytes on collagne gels of defined mechanical strength. Cell. Biol. Intern. Rep., 14, 1033-1045.

RHEINWALD, J.G. et GREEN, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell, 6, 331-344.

RIDGE, M.D. et WRIGHT, V. (1966). The directional effects of skin. J. Invest. Dermatol., 46, 341-346.

ROBINSON, J.K., GARDNER,J.M., TANTE, P.M., LEIBOVICH, S.J., LAUTENSCHLAGER, E.P. et HARTZ, R.S. (1987). Wound healing in porcine skin followin low-output carbon dioxide laser irradiation of the incision. Ann. Plast. Surg., 18, 499-505.

ROMPRÉ, P., AUGER, F.A., GERMAIN, L. BOUVARD, V., LÓPEZ VALLE, C.A. THIBAULT, J. et LeDUY, A. (1990). Influence of initial collagen and cellular concentrations on the final surface area of dermal and skin equivalents: A Box-Behnken analysis. In Vitro Cell. Dev. Biol., 26, 983-990.

SAADA, A.S. (1993). Elasticity Theory and Applications. Krieger Publishing Company, Florida, 588-590.

SACKS, M.S. et CHUONG, C.J. (1993). Biaxial mechanical properties of passive right ventricular free wall myocardium. J. Biomech. Eng., 115, 202-204.

SAKATA, K., PARFITT, G. et PINDER, K.L. (1972). Compressive behavior of physiological tissue. Biorheology, 9, 173-184.

SALTER, D.C., McARTHUR, H.C., CROSSE, J.E. et DICKENS, A.D. (1993). Skin mechanics measured *in vivo* using torsion: a new and accurate model more sensitive to age, sex and moisturizing treatment. Int. J. Cosmetic Sci., 304, 566-579.

SANDBERG, L.B., SOSKEL, N.T. et LESLIE, J.G. (1981). Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states. N. Engl. J. Med., 15, 200-218.

SANDERS, J.E., GOLDSTEIN, B.S. et LEOTTA D.F. (1995). Skin response to mechanical stress: adaptation rather than breakdown— A review of the litterature. J. Rehab. Res. Dev., 32, 214-226.

SANDERS, J.E., GOLDSTEIN, B.S. et LEOTTA, D.F. (1995). Skin response to mechanical stress: adaptation rather than breakdown- A review of the litterature. J. Rehab. Res. Dev., 32, 214-226.

SANDERS, J.E., LEOTTA, D.F. et GOLDSTEIN, B.S. (1993). Skin adaptation to mechanical stress. Proc. IEEE San Diego, 1114-1115.

SASAKI, N. et ODAJIMA, S. (1996a). Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique. J. Biomech., 29, 655-658.

SASAKI, N. et ODAJIMA, S. (1996b). Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. J. Biomech., 29, 1131-1136.

SCHOBER, E.A., KUSY, R.P. et SAVITZ, D.A. (1994). Resistance of fetal membranes to concentrated force applications and reconciliation of puncture and burst testing. Ann. Biomed. Eng., 22, 540-548.

SCOTT, J.E. (1984). The periphery of the developing collagen fibril. Quantitative relationships with dermatan sulphate and other surface associated species. Biochem. J., 218, 229-233.

SEAH, C.S. (1992). Skin graft and skin equivalent in burns. Ann. Acad. Med., 21, 685-688.

SERUP, J. (1996). The 20-year anniversary of the ISBS. Skin Res. Technol., 2, 1.

SHOEMAKER, P.A., SCHNEIDER, D., LEE, M.C. et FUNG, Y.C. (1986). A constitutive model for two-dimensional soft tissues and its application to experimental data. J. Biomech., 19, 695-702.

SILVER, F.H. (1987). Biological materials: structure, mechanical properties, and modeling of soft tissues. N.Y. University Press., 1-68,75-79, 136-163, 174-178.

SILVER, F.H. et DOILLON, C. (1989). Biocompatibility: polymers. V.C.H. Publishers Inc., N.Y., 199-218.

SILVER, F.H. et MILLER, J. (1994). Vizualizing collagen fibril growth. J. Mol. Graphics, 12, 139-145.

SILVER, F.H. et TRELSTAD, R.L. (1980). Type I collagen in solution: structure and properties of fibril fragments. J. Biol. Chem., 255, 9427-9433.

SKALAK, R. (1993). Tissue engineering. Proc. I.E.E.E. San Diego, 1112-1113.

SOONG, T.T. et HUANG, W.N. (1973). A stochastic model for biological tissue elasticity in simple elongation. J. Biomech., 6, 451-458.

SQUIER, C.A. (1980). The stretching of mouse skin in vivo: effect on epidermal proliferation and thickness. J. Invest. Dermatol., 74, 68-71.

STARK, H.L. (1977). Directional variations in the extensibility of human skin. Br. J. Plast. Surg., 30, 105-114.

STOPAK, D. et HARRIS, A.K. (1982). Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction-I. Tissue culture observations. Dev. Biol., 90, 383-398.

STOPPIE, P., BORGHGRAEF, P, DE WEVER, B., GEYSEN, J. et BORGERS, M. (1993). The epidermal architecture of an *in vitro* reconstructed human skin equivalent. Europ. J. Morph., 31, 26-29.

STRICK, T.R., ALLEMAND, J.-F., BENSIMON, D., BENSIMON, A. et CROQUETTE, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. Science, 271, 1835-1837.

SUZUKI, E., FRASER, R.D.B. et MAcRAE (1980). Role of hydroxyproline in the stabilization of the collagen moleculer via water molecules. Int. J. Biol. Macromol., 2, 54-56.

TAKEMA, Y., YORIMOTO, Y., KAWAI, M. et IMOKAWA, G. (1994). Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. Br. J. Dermatol., 131, 641-648.

TANNER, J. VANDEPUT, J. et OLLEY, J. (1964). The mesh skin graft. Plast. Reconstr. Surg., 34, 287-292.

TAVIS, M.J., THORNTON, J.W., HARNEY, J.H., WOODROOF, E.A. et BARTLETT, R.H. (1976). Graft sdherence to de-epithelialized surfaces. Ann. Surg., 184, 594-600.

THIBAULT, L.E. et FRY, D.L. (1983). Mechanical characterization of membranelike biological tissue. J. Biomech. Eng., 105, 31-38.

TIOLLIER, J., DUMAS, H., TARDY, M. et al. (1990). Fibroblast behavior on gels of type I, III and IV human placental collagens. Exp.Cell Res., 191, 95-104.

TOMASEK, J.J. et AKIYAMA, S.K. (1992). Fibroblast-mediated collagen gel contraction does not require fibronectin-$\alpha_5\beta_1$ integrin interaction. Anatomical Rec., 234, 153-160.

TOMASEK, J.J., HAY, E.D et FUJIWARA, K. (1982). Collagen modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroma fibroblasts: Distribution of actin, alpha-actinin, and myosin. Dev. Biol., 92, 107-122.

TONG, P. et FUNG, Y.C. (1976). The stress-strain relationship for the skin. J. Biomech., 9, 649-657.

TOSTI, A., COMPAGNO, G., FAZZINI, M.L. et VILLARDITA, S. (1977). A ballistometer for the study of the plasto-elastic properties of skin. J. Invest. Dermatol., 69, 315-317.

TRANQUILLO, R.T., GIRTON, T.S., BROMBEREK, B.A., TRIEBES, T.G. et MOORADIAN, D.L. (1996). Magnetically orientated tissue-equivalent tubes: application to a circumferentially orientated media-equivalent. Biomaterials, 17, 349-357.

TREGEAR, R.T. et DIRNHUBER, P. (1965). Viscous flow in compressed human and rat skin. J. Invest. Dermatol., 45, 119-125.

TRELSTAD, R.L., HAYASHI, K. et TOOLE, B.P. (1974). Epithelial collagnes and glycosaminoglycans in the embryonic cornea. Macromolecular order and morphogenesis in the basement membrane. J. Cell. Biol., 62, 815-830.

TRUS, B.L. et PIEZ, K.A. (1980). Compressed microfibril models of the native collagen fibril. Nature, 286, 300-301.

UITTO, J. et EISEN, A.Z. (1987). Collagen. Dermatology in general medecine, T.B. Fitzpatrick, A.Z. Eisen, K. Wolff, I.M. Freedberg, K.F. Austen, McGraw-Hill, N.Y., 259-287.

UITTO, J. et LICHTENSTEIN, J.R. (1976). Deffects in the biochemistry of collagen in diseases of connective tissue. J. Invest. Dermatol., 66, 59.

URBAN, J.P.G., MAROUDAS, A., BAYLISS, M.T. et DOILLON, J. (1979). Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. Biorheology, 16, 447-464.

van DORP, A.G.M., VERHOEVEN, M.C.H., van der NAT-VAN der MEIJ, T., KOERTEN, H.K., PONEC, M. et van BLITTE4SWIJK, C.A. (1994). Dermal regeneration in full-thickness wounds in yucatan mini pigs using a biodegradable copolymer. Trans. Soc. Biomat., 17, 36.

VAWTER, D.L., FUNG, Y.C. et WEST, J.B. (1978). Elasticity of excised dog lung parenchyma. J. Appl. Physiol., 45, 261-260.

VERONDA, D.R. et WESTMANN, R.A. (1970). Mechanical characterization of skin-finite deformations. J. Biomech., 3, 111-124.

VIATOUR, M., HENRY, F. et PIÉRARD, G.E. (1995). A computerized analysis of intrinsic forces ins skin. Clin. Exp. Dermatol., 20, 308-312.

VIIDIK, A. (1968). A rheological model for uncalcified parallel-fibered collagenous tissue. J. Biomech., 1, 3-11.

VIIDIK, A. (1973). Functional properties of collagenous tissues. Int. Rev. Conn. Tiss. Res., 6, 127-215.

VITO, R.P. (1980). The mechanical properties of soft tissues-I. A mechanical system for biaxial testing. J. Biomech., 13, 947-950.

VOGEL, H.G. (1982). Mechanical properties of rat skin as compared by *in vivo* and *in vitro* measurement. Bioeng. Skin, 3, 198-209.

VOGEL, H.G. (1987a). Age dependance of mechanical and biochemical properties of human skin. Part I. Stress-strain experiments, skin thickness and biochemical analysis. Bioeng. Skin, 3, 67-91.

VOGEL, H.G. (1987b). Age dependance of mechanical and biochemical properties of human skin. Part II. Hystérésis, relaxation, creep and repeated strain experiments. Bioeng. Skin, 3, 141-176.

VOLLMERT, B. (1973). Polymer chemistry. Springer-Verlag, NY, 448-483, 541-561.

WAN ABAS, W.A.B. (1994). Biaxial tension test of human skin *in vivo*. Bio-med. Mat. Eng, 4, 473-486.

WAN ABAS, W.A.B. et BARBENEL, J.C. (1982). Uniaxial tension test of human skin in vivo. J. Biomed. Eng., 4, 65-71.

WENSTRUP, R.J., MURAD, S. et PINNELL, S.R. (1991). Collagen. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, L.A. Godldsmith, Oxford University Press, N.Y., 481-485.

WIJN, P. (1980). The alinear viscoelastic properties of human skin *in vivo* for small deformations. Thèse de doctorat, Université de Nijmegen, 1-325

WILDNAUER, R.H., BOTHWELL, J.W. et DOUGLAS, A.B. (1971). *Stratum corneum* biomechanical properties-influence of relative humidity on normal and extracted human *stratum corneum*. J. Invest. Dermatol., 56, 72-78.

WILKES, G.L. et WILDNAUER, R.H. (1973). Structure-property relationship of the *stratum corneum* of neonata rat. II. Dynamic mechanical properties. Biochem. Biophys. Acta, 304, 276-289.

WILKINS, L.M., WATSON, S.R., PROSKY, S.J., MEUNIER, S.F. et PARENTEAU, N. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotech. Bioeng., 43, 747-756.

WILLIAMS, J.L., CHEN, J.H. et BELLOLI, D.M. (1992). Strain field on cell stressing devices employing clamped circular elastic diaphragms as substrates. J. Biomech. Eng., 114, 377-384.

WITKOWDKI, J.A. et PARISH, L.C. (1993). Skin failure and the pressur ulcer. Decubitus, 6, 4.

WOO, S.L.-Y., JOHNSON, G.A. et SMITH, B.A. (1993). Mathematical modeling of ligamens and tendons. J. Biochem. Eng., 115, 468-473.

WOOD, G.C. et KEECH, M.K. (1960). The formation of fibrils from collagen solutions. 1. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. J. Biochem., 75, 588-597.

WOODLEY, D.T., YAMAUCHI M., WYNN, K.C., MECHANIC, G. et BRIGGAWAN, R.A. (1991). Collagen Telopeptides (Cross-Linking Sites) Play a Role in Collagen Gel Lattice Contraction. J. Invest. Dermatol., 97, 580-585.

WOODS, A., COUCHMAN, J.R. et HOOK, M. (1985). Heparan sulfate proteoglycans of rat embryo fibroblasts. A hydrophobic form may likk cytoskeleton and matrix components. J. Biol. Chem., 260, 10872-10879.

WYSOCKI, A.B. (1995). A review of the skin and its appendages. Adv. Wound Care, 8, 53-70.

XU, W., GERMAIN L., GOULET, F. et AUGER, F.A. (1996). Permanent Grafting of Living Skin Substitutes: Surgical Parameters to Control Successful Results. J. Burn Care Rehabil., 17, 7-13.

YAHIA, L'H. (1984). Modélisation du ligament croisé antérieur basée sur sa microstructure anatomique et les interactions entre ses composantes biomacromoléculaire. Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal, 1-402.

YANNAS, I.V. (1995). Regeneration templates. The biomedical engineering handbook. J.P. Bronzino, CRC Press, N.Y., 1619-1635.

YANNAS, I.V., BURKE, J.F., ORGILL, D.P. et SKRABUT, E.M. (1982). Wound tissue can utilize a polymeric template to synthetize a functional extension of skin. Science, 215, 174-176.

YARKONY, G.M. (1993). Aging skin, pressure ulcerations, and spinal cord injury. Aging with spinal cord injury. G.G. Whiteneck, S.W. Charlifue, K.A. Gerhart, D.P. Lammertse, S. Manley, R.R. Menter, K.R. Seedroff, Demos Publications, N.Y., 39-52.

YIN, F.C.P., TOMPKINS, W.R., PETERSON, K.L. et INTAGLIETTA, M. (1972). A video-dimension analyzer. I.E.E.E. Trans. Biomed. Eng., 19, 376-381.

ZWEIFACH, B.W. (1970). Biomechanics and physiology. Biomechanics: Its foundations and objectives. Y.C. Fung, N. Perrone, M. Anliker, Prentice-Hall, N.J., 3-13.