

Université de Montréal

**Évaluation d'une forme topique
à base des dérivés alkylés du chitosan,
en vue d'améliorer la cicatrisation cutanée**

Par

SANDRA BIAGINI

Faculté de Pharmacie

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques**

Août, 2001

© Sandra Biagini, 2001



QV
705
N58
2001
N.014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Évaluation d'une forme topique
à base de dérivés alkylés du chitosan,
en vue d'améliorer la cicatrisation cutanée**

Présenté par :

Sandra Biagini

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Professeur Louis Cartilier

Président rapporteur du jury

Professeur Jean Norbert McMullen

Directeur de recherche

Docteur Robert Orvoine

Membre

Mémoire accepté le

REMERCIEMENTS

A M. le Professeur Louis Cartilier,

Vous nous faites le très grand honneur de présider ce jury.

Permettez-nous de vous exprimer notre profonde admiration et notre respectueuse gratitude.

A M. le Professeur Jean Norbert McMullen,

Vous avez largement contribué à la réalisation de ce mémoire qui n'aurait jamais été accompli sans vos conseils et vos directives.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude pour l'honneur que vous nous avez accordé en nous acceptant au sein de votre laboratoire.

Au Docteur Robert Orvoine,

Nous vous remercions pour l'intérêt que vous nous accordez en acceptant de juger notre mémoire.

A M. Daniel Morency,

Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez manifesté en acceptant de collaborer à la réalisation de l'étude microbiologique.

À Renée et Mario :

Vous qui m'avez offert tout votre amour et votre affection.

J'espère que vous trouverez dans ce mémoire l'expression de ma gratitude envers tous vos sacrifices afin de voir se réaliser mes rêves ;

À vous, parents exceptionnels, je dédie ce mémoire.

À mes amis,

que j'ai eu la chance de connaître.

Je n'oublierai jamais votre soutien et votre encouragement qui m'ont aidé à surmonter toutes les difficultés

SOMMAIRE

La présente étude s'inscrit dans le domaine du développement d'une forme galénique à usage topique dans des fins de traitements visant la cicatrisation cutanée. Après une rupture accidentelle ou chirurgicale de la peau, un mécanisme de cicatrisation complexe et multifactoriel se déclenche dans le but de rétablir l'intégrité et la continuité de la surface cutanée.

Un polymère naturel, le chitosan, modifié par alkylation fait l'objet de l'étude en tant que matériel agissant sur la cicatrisation cutanée. Le chitosan, polymère existant à l'état naturel, est chimiquement synthétisé par désacétylation partielle de la chitine. Le chitosan peut subir plusieurs modifications afin de donner naissance à des dérivés dotés de plusieurs propriétés biologiques. La capacité d'immobilisation cellulaire rend le chitosan et ses dérivés capables de prévenir l'infection des plaies en bloquant les cellules microbiennes. Leur structure chimique et leur comportement à l'égard de certains éléments de la cicatrisation leur permettent d'interférer avec le processus normal de cicatrisation cutanée.

Cette étude comprend quatre étapes. La première consiste à synthétiser les dérivés alkylés du chitosan, substitués à 20% et à 80% au niveau du groupement amine du carbone en 2. Les groupements substitutifs employés sont les groupements acétyl, butyryl et caproyl.

La détermination du degré de substitution des différents dérivés employés est faite dans le but d'établir un tableau comparatif entre un dérivé à faible degré de substitution et un autre dont le degré de substitution est élevé. Un exemple de la validation du degré de substitution faite par spectroscopie RMN (^1H) a été rapporté.

La seconde étape traite de la méthode d'obtention des fibres. Il s'agit de la coagulation des dérivés sous l'effet d'un flux laminaire d'agent coagulant. Les dérivés réduits en fibres sont lavés en premier lieu à l'alcool isopropylique, et en second lieu à l'éther éthylique.

La troisième étape consiste à obtenir à partir des fibres, une pellicule mince destinée à être appliquée sur la surface cutanée, dans le but d'assurer un traitement topique, mécanique et anti-infectieux des plaies. La préparation des pellicules nécessite une détermination de la quantité de fibres à utiliser dans chaque lot et se fait par compression mécanique.

La quatrième et dernière étape de l'étude consiste à évaluer l'activité microbiologique des dérivés synthétisés, dans le but d'évaluer leur efficacité dans la prévention des infections bactériennes des plaies. Cette étape nécessite une détermination rigoureuse de la charge bactérienne de départ évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre dans le visible. L'utilisation d'un tel appareil requiert une calibration dans le but d'établir une relation mathématique entre l'absorbance lue au spectrophotomètre et la charge bactérienne.

Tous ces éléments visent à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chacun des dérivés, à 20% et à 80% de substitution, vis à vis de deux souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats expérimentaux sont interprétés à la lumière d'autres études similaires effectuées sur le chitosan et sur d'autres dérivés du chitosan.

Les fibres ont été évaluées à l'aide de photographies digitales prises après observation au microscope optique. L'observation et la comparaison entre les deux procédés de lavage des fibres sont rendues possibles grâce à des photographies obtenues par microscopie à force atomique ou AFM.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
SOMMAIRE	I
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	XIII

PARTIE THÉORIQUE

I. Les plaies cutanées

1. Généralités	1
2. Classification	1
2.1 Les plaies accidentelles	1
2.2 Les plaies chirurgicales	1

II. La cicatrisation cutanée

1. Définition	3
2. Classification de la cicatrisation	3
2.1 La cicatrisation par première intention	3
2.2 La cicatrisation par deuxième intention	3
2.3 La cicatrisation par première intention retardée	3
3. Mécanisme de la cicatrisation	4
3.1 Hémostase	4
3.2 Phase inflammatoire	6
3.3 Phase de prolifération-Formation du tissu de granulation	7
3.4 Remodelage	9
3.5 Résolution	10
4. Facteurs qui affectent la cicatrisation cutanée	10
4.1 L'infection bactérienne	10
4.2 La nutrition	10
4.2.1 Les protéines	10
4.2.2 Les vitamines et les oligo-éléments	11
4.3 L'oxygène	12
4.4 La médication	12
4.4.1 Les hormones cortico-stéroïdes	12
4.4.2 L'histamine	13
4.4.3 Les anti-inflammatoires	13
4.4.4 Les agents anti-néoplasiques	13
4.5 Le diabète	14
4.6 La température environnante	14
4.7 L'âge	14
5. Complications de la cicatrisation cutanée	15
5.1 La fibrose	15
5.2 Les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes	15
5.3 L'infection bactérienne	16

III. Traitement des plaies cutanées

1. La suture	18
1.1 Les fils de suture résorbables	18
1.2 Les fils de suture non-résorbables	18
2. Les traitements classiques	18
2.1 Le débridement	18
2.1.1 Le débridement sélectif	19
2.1.1.1 Le débridement enzymatique	19
2.1.1.2 L'autolyse	19
2.1.1.3 L'excision chirurgicale	19
2.1.2 Le débridement non-sélectif	20
2.1.2.1 Le débridement mécanique	20
2.1.2.2 Les pansements débridants	20
2.2 L'antibiothérapie	20
2.3 L'hydrothérapie	21
2.4 Les agents topiques	21
2.4.1 Les agents nettoyants des plaies	21
2.4.1.1 L'hypochlorite	21
2.4.1.2 Autres nettoyants des plaies	22
2.4.2 Les pommades bactéricides	23
2.5 Les pansements synthétiques	23
2.5.1 Les critères d'un pansement idéal	23
2.5.1.1 Le contrôle de l'hydratation	24
2.5.1.2 La perméabilité aux gaz	24
2.5.1.3 L'effet du pH	25
2.5.1.4 La libération de particules toxiques et de particules de matières	26
2.5.1.5 La faible adhérence	26
2.5.1.6 L'étanchéité aux micro-organismes	26
2.5.1.7 Les propriétés thermiques	26

2.5.2	Différentes sortes de pansements	27
2.5.2.1	Les matériaux de contact primaire	27
2.5.2.2	Les films semi-perméables	27
2.5.2.3	Les mousses semi-perméables	29
2.5.2.4	Les alginates	29
2.5.2.5	Les hydrogels semi-perméables	30
2.5.2.6	Les hydrocolloïdes	32
2.5.2.7	Les saccharides	33
2.5.2.8	Les pansements qui absorbent les odeurs	34
2.5.3	Critères de sélection d'un pansement	35
2.6	Les pansements biologiques	35
3.	La stimulation électrique	36
4.	L'ultrason	36
5.	La lumière	37
6.	L'oxygène hyperbare	37
IV.	Le chitosan	
1.	Généralités	38
1.1	La chitine et le chitosan	38
1.2	Sources naturelles	39
2.	Dénomination et formule structurale	39
3.	Synthèse chimique du chitosan	39
4.	Propriétés physico-chimiques	40
5.	Modification chimique du chitosan	40
5.1	Acylation	40
5.2	Carboxylation	41
5.3	Sulfatation	41
5.4	Formation de sels quaternaires	41

6. Applications	41
6.1 Applications en pharmacie	41
6.1.1 Agent facilitant l'absorption des médicaments	41
6.1.2 Matrice dans les systèmes de libération contrôlée des médicaments	42
6.2 Applications en médecine	42
6.2.1 L'immuno-stimulation	42
6.2.2 L'immobilisation cellulaire	42
6.2.2.1 Activité anti-tumorale	42
6.2.2.2 Activité anti-microbienne	43
6.2.2.3 Activité hémostatique	44
6.2.3 L'activité cicatrisante	45
6.3 Autres applications	47
6.3.1 En dentisterie	47
6.3.2 Analyse et séparation	47
6.3.3 En agriculture	48
6.3.4 Traitement des eaux usées	48
6.3.5 Industrie cosmétique	48
6.3.6 Industrie alimentaire	48
6.3.7 En diététique	49
6.3.8 En médecine vétérinaire	49
7. Formes physiques du chitosan et/ou des dérivés du chitosan	50
V. Objectifs de l'étude	51

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel

1. Réactifs utilisés	53
2. Appareillage	54

II. Méthodes

1. Purification du chitosan	55
2. Synthèse des dérivés alkylés du chitosan	56
2.1 Détermination du degré de substitution	57
2.2 Validation du degré de substitution	57
3. Obtention des fibres	58
3.1 Evaluation des fibres	59
4. Formation des pellicules	59
4.1 Détermination de la quantité de fibres à utiliser	59
4.2 Préparation proprement dite de la pellicule	60
4.3 Effet de la nature du dérivé de chitosan et du degré de substitution sur la densité des pellicules	61
4.4 Evaluation des pellicules	61
4.4.1 La microscopie optique	61
4.4.2 La microscopie à force atomique	62
5. Etude <i>in vitro</i> de l'activité microbiologique- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	63
5.1 Le milieu de culture	63
5.2 L'inoculum	63
5.3 Les échantillons	63

5.4 Détermination proprement dite de la CMI	64
5.4.1 Détermination de la charge bactérienne de départ par comptage des unités formant des colonies	64
5.4.2 Relation entre la charge bactérienne et l'absorbance de la suspension	65
5.4.3 Mode opératoire	68
III. Résultats et discussions	
1. Exemple de validation du degré de substitution	71
2. Obtention des fibres	71
3. Formation des pellicules	75
3.1 Effet de la nature du dérivé de chitosan et du degré de substitution sur la densité des pellicules	75
3.2 Evaluation des pellicules	76
4. Etude <i>in vitro</i> de l'activité microbiologique-Détermination de la CMI	86
4.1 Relation entre la charge bactérienne et l'absorbance	86
4.2 Détermination de la CMI de l'acide acétique	87
4.3 Détermination proprement dite de la CMI	89
4.4 Etude de la stérilisation des échantillons	92
IV. Conclusions	95
BIBLIOGRAPHIE	98
ANNEXE	

LISTE DES FIGURES

Figures	Pages
1. Mécanisme de la cicatrisation cutanée	5
2. Synthèse du collagène	8
3. Hydrogel amorphe	31
4. Représentation schématique d'une coupe transversale d'un pansement d'hydrogel	31
5. Formule structurale de la chitine	38
6. Formule structurale du chitosan	39
7. Rôle des lysozymes dans la cicatrisation cutanée	46
8. Obtention des fibres	59
9. Formation des pellicules	61
10. Comptage des unités formant des colonies	65
11. Courbes théorique et expérimentale de l'absorbance (à 420 nm) en fonction de la concentration bactérienne	67
12. Exemple de détermination de la CMI	68
13. Fibres A mouillées à l'alcool isopropylique	73

14. Fibres A sèches	73
15. Fibres B mouillées à l'éther éthylique	74
16. Fibres B sèches	74
17. Photo du tissu en polyester	77
18. Photo de la pellicule A	77
19. Photo de la pellicule B	78
20. Photo agrandie du tissu en polyester	79
21. Photo agrandie de la pellicule A	79
22. Photo agrandie de la pellicule B	80
23. Topographie AFM du tissu en polyester	82
24. Phase AFM du tissu en polyester	82
25. Topographie AFM de la pellicule A	83
26. Phase AFM de la pellicule A	83
27. Topographie AFM de la pellicule B	84
28. Phase AFM de la pellicule B	84

- 29.** Courbe de calibration de l'absorbance en fonction
de la charge bactérienne en *Staphylococcus aureus* 86
- 30.** Courbe de calibration de l'absorbance en fonction
de la charge bactérienne en *Pseudomonas aeruginosa* 87

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Pages
I. Formes physiques correspondant aux différentes applications du chitosan	50
II. Volume d'anhydride correspondant au degré de substitution	57
III. Effet de la nature du dérivé de chitosan et du degré de substitution sur la densité des pellicules	76
IV. Concentration molaire des solutions à 3.2 mg/ml	89
V. CMI du N-acétyl chitosan à 20% et à 80% de substitution	91
VI. CMI du N-butyryl chitosan à 20% et à 80% de substitution	91
VII. CMI du N-caproyl chitosan à 20% et à 80% de substitution	91

PARTIE THÉORIQUE

I. LES PLAIES CUTANÉES :

1. Généralités:

Une plaie est définie comme étant une rupture de la continuité tissulaire. La réparation d'un tel dommage se fait en rétablissant cette continuité par la prolifération, la migration et la différenciation des cellules impliquées¹.

2. Classification des plaies :

On distingue deux sortes de plaies : Les plaies accidentelles et les plaies chirurgicales².

2.1 Les plaies accidentelles :

Les plaies accidentelles résultent soit d'un trauma d'origine domestique, soit d'accidents de travail. Ces plaies sont initialement infectées.

Exemples : brûlures, blessures, etc.

2.2 Les plaies chirurgicales :

Les plaies chirurgicales peuvent être classifiées selon le risque de contamination bactérienne au moment de la chirurgie :

- Les plaies propres : elles résultent d'une chirurgie électorive des tissus non infectés.

Le risque d'infection des plaies propres varie de 0.5 à 1.5 %.

- Les plaies secondairement contaminées : elles résultent d'une faute de technique chirurgicale, d'une stérilisation défectueuse des instruments, d'une incision de la muqueuse oropharyngée ou du drainage d'une collection purulente. Dans ce cas, le risque d'infection varie de 10 à 30 %.
- Les plaies contaminées : elles résultent de la chirurgie des plaies d'origine traumatique et des interventions chirurgicales qui entraînent un abouchement au niveau de la peau d'un organe au contenu infecté. En absence d'antibiotiques, l'infection est presque certaine.

- Les plaies sales et infectées : Elles résultent de la déhiscence des plaies.
Ce cas se présente quand le trauma a lieu plusieurs heures à plusieurs jours avant la chirurgie et quand les opérations chirurgicales sont faites sur des abcès francs.

II. LA CICATRISATION CUTANÉE

1. Définition :

La cicatrisation est définie comme étant une réponse de l'organisme, dynamique et immédiate, face à une atteinte tissulaire, dans le but de rétablir la continuité anatomique, structurale et fonctionnelle des tissus.

Le succès ou l'échec de la cascade de cicatrisation dépend largement de l'immuno-compétence du sujet.

2. Classification de la cicatrisation :

La cicatrisation cutanée peut être classifiée selon les contributions différées de la déposition du tissu conjonctif, de l'épithélialisation et de la contraction des plaies¹. La contribution de chacun de ces processus varie selon le type de la plaie et du dommage tissulaire à réparer. En plus, l'intervention thérapeutique choisie peut influencer le type de cicatrisation.

2.1 La cicatrisation par première intention :

Elle résulte des interventions chirurgicales où les plaies sont fermées directement par suture des bords. Ces plaies cicatrisent principalement par déposition du tissu conjonctif¹.

2.2 La cicatrisation par deuxième intention :

Elle résulte de l'application des pansements et concerne les plaies maintenues ouvertes. Ces plaies cicatrisent par contraction en contribution avec l'épithélialisation et la déposition du tissu conjonctif¹.

2.3 La cicatrisation par première intention retardée :

Elle concerne les plaies infectées qui sont maintenues ouvertes pendant 1 ou 2 jours afin d'éviter l'infection, puis fermées chirurgicalement. Ces plaies

cicatrisent principalement par déposition du tissu conjonctif, par épithélialisation et par contraction des bords de la plaie.

3. Mécanisme de la cicatrisation :

La cicatrisation est une séquence d'événements complexes qui nécessitent une corrélation étroite entre les cellules³. On pourrait diviser la cicatrisation en cinq étapes coïncidant approximativement avec la séquence temporelle de la cicatrisation normale : l'hémostase, la phase inflammatoire, la phase de prolifération, le remodelage et la résolution (Figure 1).

3.1 Hémostase:

Suite à une plaie, les éléments de l'épiderme et du derme y compris le réseau vasculaire cutané se rompent, induisant une extravasation des composants du sang. Cette stimulation mécanique conduit à la formation d'un caillot sanguin résultant du clivage du fibrinogène en fibrine sous l'effet de la thrombine, pour former un caillot de fibrine. Ce dernier, en collaboration avec la fibronectine, protège les tissus endommagés et joue le rôle d'une matrice qui attire les cellules inflammatoires^{4, 5} (polynucléaires neutrophiles et macrophages). Il permet également la migration des fibroblastes et d'autres cellules résidentes.

Les plaquettes sont les premiers éléments cellulaires à coloniser une plaie. Par la sérotonine qu'elles libèrent, elles provoquent la constriction des artérioles, en plus de contribuer à la formation du caillot sanguin. Ces deux mécanismes entraînent l'arrêt du saignement⁴.

En plus de ce rôle hémostatique, les plaquettes influencent la réponse cellulaire subséquente au niveau de la plaie. Elles libèrent les facteurs de croissance responsables du chimiotactisme des cellules musculaires lisses (Platelet Derived Growth Factor, PDGF⁶), des fibroblastes (PDGF⁷, Transforming Growth Factor- β , TGF- β) et des cellules inflammatoires (TGF- β).

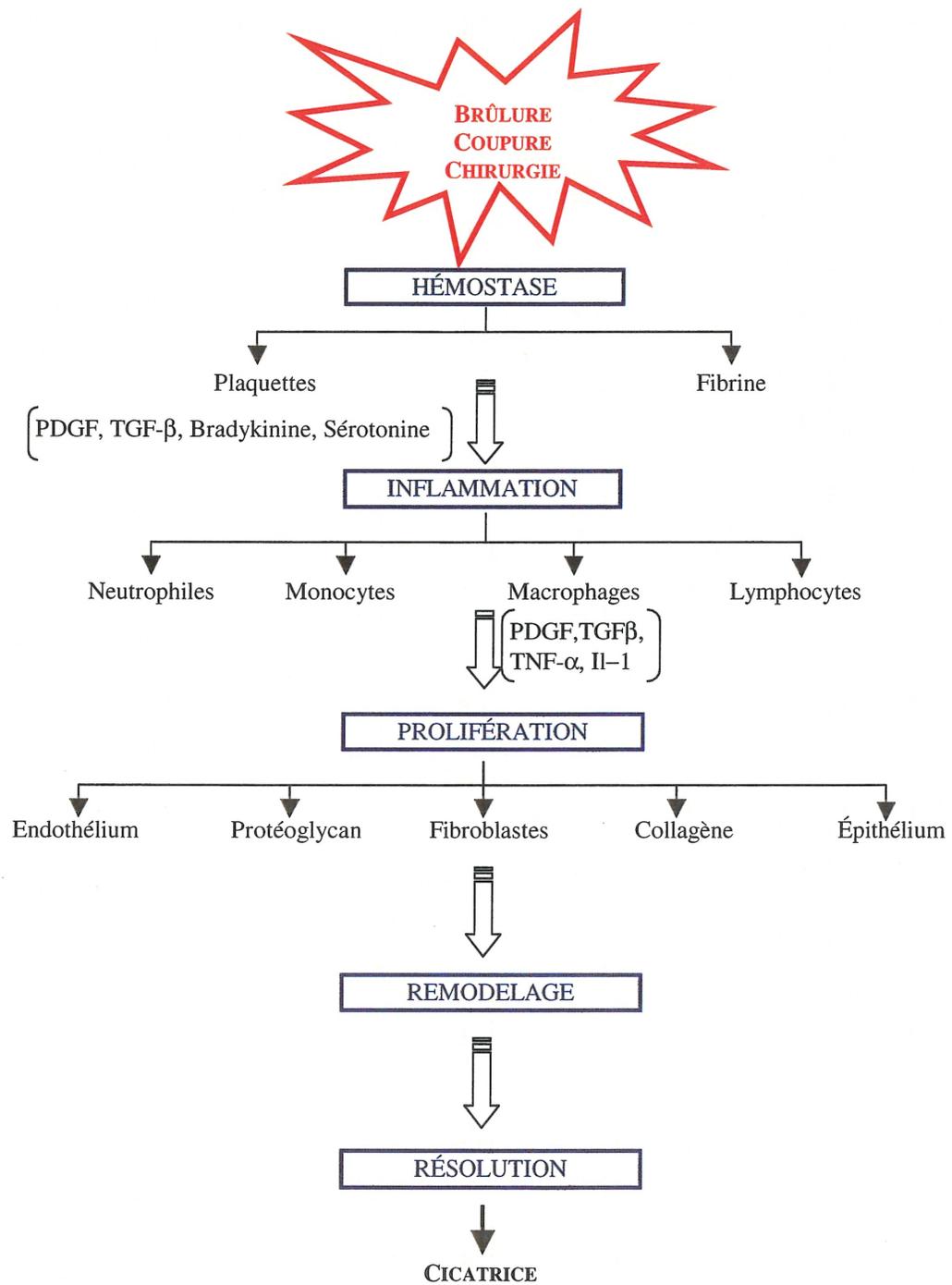


Figure 1 : Mécanisme de la cicatrisation cutanée

3.2 Phase inflammatoire

Les plaquettes activées libèrent des médiateurs chimiques tels que la bradykinine et la sérotonine. Cette dernière augmente la perméabilité des veinules en écartant les cellules endothéliales, ce qui favorise la transsudation du plasma et la leucodiapédèse³.

Simultanément, des agents sanguins et des agents en provenance du tissu endommagé stimulent les cellules inflammatoires qui adhèrent aux parois des vaisseaux sanguins et passent ainsi entre les cellules endothéliales qui les tapissent. Ces cellules migrent ensuite au site inflammatoire par chimiotactisme.

Les polynucléaires neutrophiles ont essentiellement un rôle phagocytaire qui contrôle la contamination bactérienne locale et détruit le tissu dévitalisé⁸. L'infiltration des polynucléaires neutrophiles décroît face à l'augmentation progressive des monocytes. Les monocytes se convertissent en macrophages qui poursuivent la destruction bactérienne et le nettoyage de la plaie. Les macrophages ont également un rôle majeur dans le phénomène de cicatrisation : ils participent en effet au recrutement des fibroblastes et à la déposition du collagène⁹. Ils sécrètent des agents chimiotactiques et des facteurs de croissance tels que le PDGF, le TGF- β et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)¹⁰. Ces facteurs sont mitogènes et ils induisent le chimiotactisme des cellules endothéliales qui entourent la plaie et migrent au site inflammatoire pour participer à la néovascularisation.

Les macrophages sont aussi responsables de la sécrétion d'autres cytokines tels que l'Interleukine-1 (IL-1) et le TNF- α .

D'autres cellules telles que les lymphocytes, les plasmocytes et les mastocytes participent avec les polynucléaires et les macrophages au processus de cicatrisation.

La composition de la matrice d'une plaie varie durant la phase inflammatoire⁸. L'augmentation de la perméabilité vasculaire conduit à l'établissement de l'inflammation aigüe, et la transsudation des composants du plasma permet

l'entrée du complément, des anticorps et d'autres composants plasmatiques dans la plaie. La fibrine initialement engendrée par l'hémostase est remplacée par les glycosaminoglycans et par les protéoglycans⁴.

3.3 Phase de prolifération-Formation du tissu de granulation:

Cette phase débute 3 à 4 jours après la blessure. Elle suit la sécrétion des facteurs de croissance qui affectent la migration et l'activité de ces cellules. Elle est caractérisée par la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales, et par la néovascularisation. L'épithélialisation est primordiale surtout dans le cas des plaies partiellement profondes et lorsque la cicatrisation se fait par seconde intention. La migration cellulaire est guidée par la matrice provisoire au niveau de la plaie, par le plan anatomique du tissu et par les plans alignés selon la tension le long de la plaie⁴.

Les fibroblastes sont responsables de la production du collagène (Figure 2). Le procollagène synthétisé dans les fibroblastes est constitué d'une triple hélice de chaînes polypeptidiques et d'hydroxyproline. Le procollagène libéré dans le milieu extracellulaire subit un clivage par les peptidases et se transforme en tropocollagène. Des liaisons hydrogène puis des liaisons covalentes solides, intramoléculaires et intermoléculaires, s'établissent entre les molécules de tropocollagène pour former une structure en hélice. L'association de ces hélices conduit à la formation des fibrilles de collagène qui s'associent entre elles pour former les fibres de collagène¹¹.

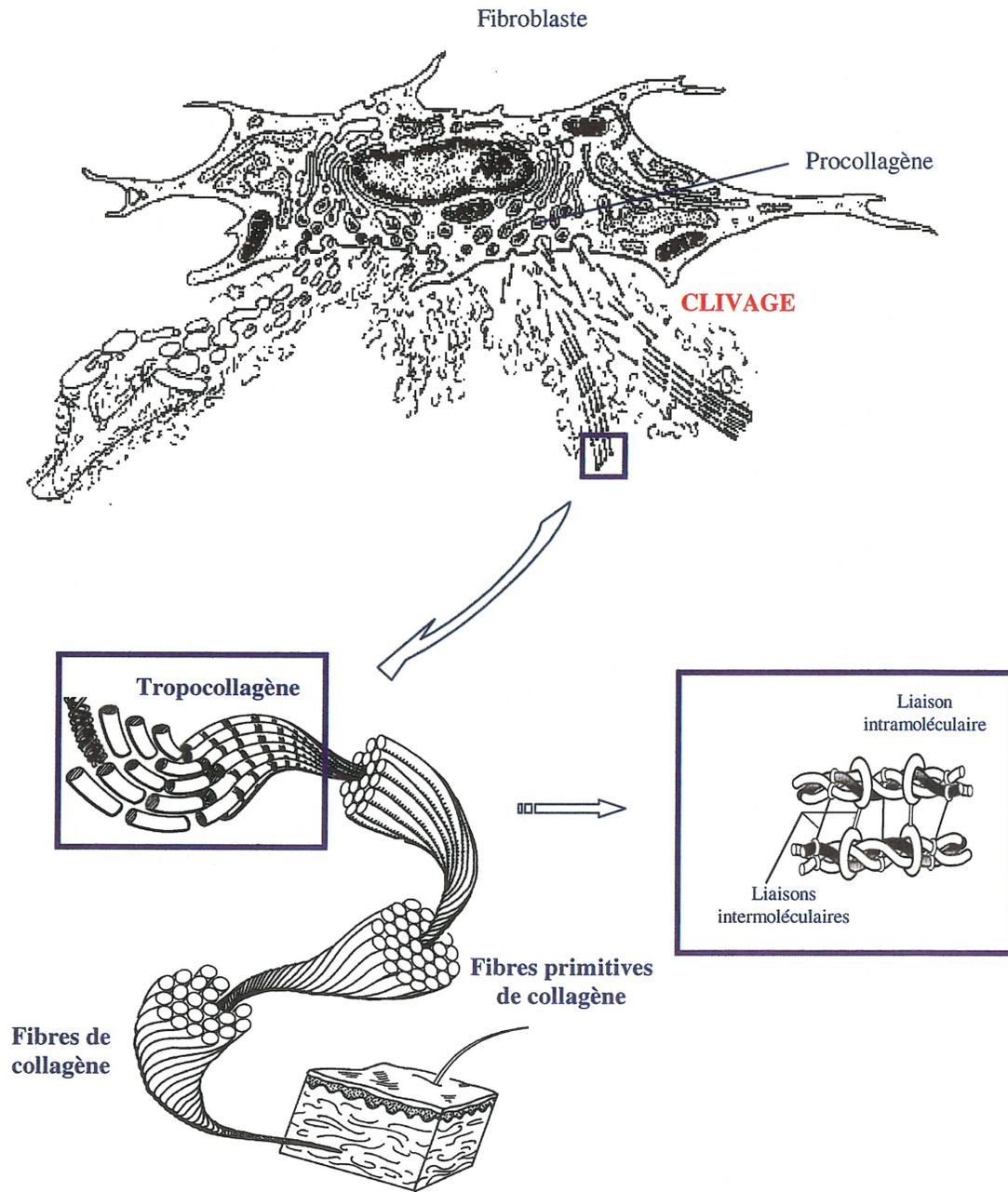


Figure 2 : Synthèse du collagène

Deux types de collagène sont impliqués dans le processus de cicatrisation :

- Le collagène type I : est la forme de collagène prédominante dans le derme où elle se trouve normalement dans une proportion de 80% ;
- Le collagène type III : est la forme embryonnaire du collagène. Elle existe normalement dans le derme adulte dans une proportion de 15%, est remplacée avec l'âge par le collagène type I.

Ces deux types de collagène diffèrent au niveau moléculaire par la structure des chaînes polypeptidiques qui les constituent.

Les fibroblastes sont responsables de la production d'une matrice protéique où les collagènes du type I et III prédominent, ce qui fait de leur migration dans la plaie une étape cruciale de la cicatrisation. La déposition du collagène au niveau de la plaie coïncide avec la dégradation du protéoglycan et devient ainsi le composant final et permanent de la matrice d'une plaie.

Le collagène est produit aussi par les cellules musculaires lisses, par les cellules épithéliales et par les cellules endothéliales¹². Le collagène du type III est la forme initiale du collagène à occuper la plaie en cours de cicatrisation, mais cette forme est rapidement remplacée par le collagène du type I. Le collagène est une protéine majeure du tissu conjonctif, ce qui le rend responsable de la résistance de la peau et des cicatrices à l'étirement.

Le tissu de granulation est formé de macrophages, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins néoformés, d'une faible matrice de fibronectine, de collagène et d'acide hyaluronique. Après un certain temps qui dépend de la vascularisation et de l'innervation du tissu affecté, les myofibroblastes se contractent pour réduire la taille de la plaie⁴.

3.4 Remodelage :

Lors du remodelage, la néovascularisation du tissu de granulation régresse face à la progression de la cicatrisation. La principale caractéristique de cette phase est le remodelage du collagène et la formation de la cicatrice définitive. La déposition nette du collagène résulte de l'équilibre entre la collagénolyse et la

collagénosynthèse¹³, et c'est la synthèse du collagène, plus rapide que sa dégradation extracellulaire, qui conduit à la formation de la cicatrice.

Au fur et à mesure que le processus de cicatrisation progresse, les fibres de collagène deviennent plus compactes grâce à l'établissement de liaisons intermoléculaires et au changement de la structure du collagène, et grâce à l'augmentation du diamètre de ces fibres. Il en résulte une augmentation de la résistance à l'étirement¹⁴.

3.5 Résolution

Mignatti *et al.* ont décrit une étape supplémentaire de la cicatrisation. Durant cette phase, le taux de synthèse du collagène revient à sa valeur normale après 6 à 12 mois. Des enzymes du type collagénases ainsi que d'autres métalloprotéinases produites par les granulocytes, les macrophages, les cellules épidermiques et les fibroblastes assurent la dégradation du tissu de cicatrisation¹⁵.

4. Facteurs qui affectent la cicatrisation cutanée :

4.1 L'infection bactérienne :

Les bactéries influencent la cicatrisation de plusieurs façons :

- La croissance bactérienne et l'activité enzymatique détruisent le tissu local ;
- L'infection bactérienne prolonge la phase inflammatoire de la cicatrisation.

Cependant, contamination n'est pas synonyme d'infection et une infection bactérienne contrôlée peut accélérer la cicatrisation parce qu'elle stimule la réponse inflammatoire et augmente la résistance de la cicatrice à l'étirement¹⁶.

4.2 La nutrition :

4.2.1 Les protéines :

Il a été démontré qu'une diète riche en protéines augmente la résistance à l'étirement durant la phase de prolifération. Une malnutrition protéique a un

effet sur le métabolisme des protéines dans l'organisme, en particulier sur la synthèse du collagène et sur la déposition du tissu conjonctif. La malnutrition protéique peut aussi bloquer la cicatrisation à sa phase de prolifération en inhibant l'infiltration des macrophages et en réduisant la production de cytokines ¹⁷.

La cicatrisation est d'habitude inhibée lorsque la concentration en protéines du sérum est inférieure à 2g/100ml.

4.2.2 Les vitamines et les oligo-éléments :

Certaines vitamines et oligo-éléments sont des cofacteurs indispensables au processus normal de la cicatrisation.

- On a remarqué que les cicatrices sont plus aptes à la rupture chez les gens atteints de scorbut. La vitamine C ou acide ascorbique est un cofacteur de l'hydroxylation de la proline et de la lysine, elle est donc indispensable à la formation du collagène et à son maintien dans le tissu en cours de cicatrisation.
- L'effet bénéfique de la vitamine A a été étudié sur la cicatrisation retardée par administration de prednisolone. Le développement retardé du tissu de granulation et la réduction de la quantité de collagène qui en résulte sont corrigés par l'administration systémique de vitamine A. Une application topique de vitamine A accélère uniquement la réépithélialisation des blessures mais le dépôt du collagène est uniquement affecté par l'administration systémique de la vitamine A. Cependant, une dose excessive de vitamine A déstabilise la membrane lysosomiale, ce qui augmente le risque de réactions inflammatoires.
- La vitamine E stabilise les membranes. Une dose élevée de vitamine E retarde la cicatrisation.
- Le zinc est recommandé afin de renforcer les activités de l'ARN et de l'ADN polymérase. Après un trauma ou une chirurgie, le taux du zinc dans le sang et dans les tissus s'effondre. L'administration d'une quantité

suffisante de zinc augmente le taux d'épithélialisation, le taux de synthèse du collagène et la rigidité de la cicatrice.

- Le fer est un cofacteur de l'hydroxylation du collagène.
- Le cuivre est nécessaire à la désamination oxydative de la lysine¹⁷.

4.3 L'oxygène :

L'oxygène est indispensable à la migration et à la multiplication cellulaire ainsi qu'à la synthèse protéique. Il fournit l'énergie nécessaire aux différentes étapes de la cicatrisation et une quantité supplémentaire d'oxygène est requise pour la synthèse du collagène par les fibroblastes. L'oxygène est aussi indispensable à la destruction oxydative des bactéries par les leucocytes et les macrophages. Cependant, la faible pression en oxygène causée par la vasoconstriction réflexe aux environs de la plaie peut altérer la cicatrisation. L'hypovolémie causée par l'anémie ou l'hypoxémie par pertes sanguines affecte la cicatrisation des plaies vu que le sang fournit l'oxygène et les substances nutritives au tissu lésé¹⁷.

Certains chercheurs ont eu l'idée de traiter les blessures en y appliquant une atmosphère riche en oxygène. Leurs études ont démontré que la migration des fibroblastes dans une plaie augmente avec la pression partielle en oxygène (pO₂), qu'une revascularisation des zones brûlées est possible grâce à l'application d'oxygène hyperbare d'une façon intermittente et que le potentiel redox élevé au niveau des tissus saturés en oxygène est la principale barrière active contre la croissance bactérienne défavorable à la cicatrisation cutanée¹⁸.

4.4 La médication :

4.4.1 Les hormones cortico-stéroïdes :

Des études *in vivo* chez des animaux d'expérience ont montré que les hormones corticostéroïdes ont une influence sur le phénomène de cicatrisation. On note : cicatrisation retardée, inhibition de la granulation, inhibition de la contraction, diminution de la résistance à l'étirement.

L'intensité de ces effets diffère selon les espèces animales, la dose journalière, la date du début du traitement et la durée maximale du traitement.

4.4.2 L'histamine :

L'histamine possède un effet majeur sur la microvascularisation locale. Une déplétion en histamine au niveau cutané diminue la synthèse du collagène, retarde la cicatrisation et diminue la résistance des cicatrices à l'étirement. Cependant, l'injection d'histamine n'a pas une influence apparente sur la cicatrisation¹⁹.

4.4.3 Les anti-inflammatoires:

La cicatrisation cutanée peut être inhibée par tout agent capable d'abaisser le nombre de monocytes sanguins et de macrophages tissulaires, d'interférer avec la migration et la différenciation des fibroblastes et de nuire à la synthèse des protéines. De même, tout médicament capable d'inhiber la réponse circulatoire au trauma pourrait influencer la cicatrisation.

Les agents anti-inflammatoires qui interfèrent avec une des différentes étapes du mécanisme de cicatrisation peuvent avoir un effet sur une ou plusieurs de ses phases. Cependant, certains anti-inflammatoires tels que la phénylbutazone et les salicylates, administrés à des doses thérapeutiques normales, n'affectent pas la qualité de la cicatrisation²⁰.

4.4.4 Les agents anti-néoplasiques :

Plusieurs médicaments anti-néoplasiques sont responsables d'une diminution de la résistance à l'étirement des plaies cutanées chez des animaux d'expérience. Ces agents anti-néoplasiques interfèrent avec la synthèse de l'ADN et de l'ARN, avec la division cellulaire ou même avec la synthèse des protéines²¹. Par conséquent, les agents anti-néoplasiques exercent leur effet durant la phase de prolifération²².

En plus, la chimiothérapie retarde la cicatrisation à cause de la neutropénie et de la susceptibilité résultant des infections²¹.

4.5 Le diabète sucré:

Les effets du diabète sur le corps sont multiples, en particulier l'effet exercé sur la cicatrisation des plaies. Goodson et Hunt²³ ont démontré que la résistance à l'étirement et le contenu en hydroxyproline des plaies sont significativement réduits chez des rats diabétiques, en comparaison avec des rats de contrôle.

Le diabète affecte la fonction des leucocytes en altérant le chimiotactisme, la phagocytose et l'effet bactéricide intracellulaire²¹. Cet effet diminue l'efficacité de la réponse inflammatoire. L'atteinte de la fonction des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes, peut diminuer la prolifération des fibroblastes et la déposition du collagène. En plus, des maladies vasculaires périphériques et microvasculaires observées chez les diabétiques sont capables de diminuer la perfusion cutanée, et des neuropathies périphériques peuvent inhiber la sensation du toucher, conduisant ainsi à des atteintes répétées des plaies pouvant retarder la cicatrisation. Enfin, l'infection des plaies chirurgicales est 5 fois plus élevée chez les diabétiques²⁴.

4.6 La température environnante :

La résistance à l'étirement des cicatrices diminue chez des animaux exposés à une température inférieure à 28°C jusqu'au 5^e jour suivant l'opération, et des plaies ont guéri beaucoup plus rapidement à 30°C qu'à une température située entre 18 et 20°C.

4.7 L'âge :

L'âge altère la réparation d'une plaie, il agit sur presque tous les aspects de la cicatrisation²⁵.

Le taux de contraction et de fermeture des plaies ouvertes diminue avec l'augmentation de l'âge des rats. L'augmentation de la résistance à l'étirement dans le cas d'une plaie fermée observée chez des rats âgés est ralentie et le plateau de la résistance à l'étirement y est atteint plus rapidement.

5. Complications de la cicatrisation cutanée :

Certaines complications locales conduisent à un échec de la cicatrisation. Les facteurs qui interfèrent le plus avec la cicatrisation sont : la tension au niveau des bords de la plaie, l'ischémie tissulaire, l'hématome, l'infection et la rétention de corps étrangers²⁰.

5.1 La fibrose :

La fibrose est un désordre du derme. Elle est le résultat d'un dépôt excessif des composants de la matrice extracellulaire qui résulte de la destruction du tissu normal et de l'atteinte de la fonction tissulaire. Le développement de la fibrose suit les mêmes séquences que le processus de cicatrisation. Il est déterminé par trois facteurs²⁶ :

- Un stimulus répétitif qui exige un déclenchement continu du processus de fibrose ;
- Une synthèse excessive de collagène et d'autres composants de la matrice extracellulaire ;
- Une baisse de la résolution due à l'inhibition des protéases impliquées dans l'élimination du tissu cicatrisé.

5.2 Les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes :

C'est un désordre fibro-prolifératif dû à une déficience de la collagénolyse sous l'effet de l'inhibition de la collagénase par la α -macroglobuline et la α_1 -antitrypsine. Le résultat est un excès de synthèse du collagène qui mène à une croissance exagérée du tissu de cicatrisation²⁷.

Plusieurs facteurs étiologiques peuvent être impliqués : le facteur génétique (les « races » noire et orientale sont plus susceptibles au développement des chéloïdes que la « race » caucasienne), l'âge (les jeunes sont plus affectés que les adultes), la prédisposition familiale, le trauma (chirurgie, tatouage, brûlure..), la tension exercée sur les bords de la plaie, les hormones (œstrogènes, androgènes), les maladies dermiques à composante inflammatoire.

Vers la troisième semaine de la cicatrisation, les chéloïdes montrent une fibroplasie progressive sans résolution. Ils développent des nodules vasculaires entourés de fibroblastes. La masse nodulaire s'élargit et se transforme en une masse non vascularisée de collagène et de protéoglycane. Des myofibroblastes regroupant les propriétés des fibroblastes et des cellules musculaires lisses enveloppent les vaisseaux sanguins²⁷.

Les cicatrices hypertrophiques contiennent des nodules de collagène¹, mais aussi une quantité minimale d'élastine²⁸.

La différence entre les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes ne se fait ni par un test clinique ni par un test de laboratoire. Pourtant, ces deux entités diffèrent par la morphologie et par la quantité de tissu de cicatrisation produite : les cicatrices hypertrophiées produisent moins de tissu de cicatrisation que les chéloïdes. Ces derniers ont l'aspect d'une masse dure et fibreuse, presque cartilagineuse à contour irrégulier. L'apparition de l'un ou l'autre de ces deux types de complications se fait quatre à cinq semaines après guérison apparente de la plaie.

Certains chéloïdes se stabilisent et arrêtent de croître, d'autres continuent leur évolution pour donner des nécroses suppurantes. Les chéloïdes évoluent rarement vers la malignité.

5.3 L'infection bactérienne :

Toutes les plaies peuvent être contaminées par un nombre et un type variables de micro-organismes pathogènes. On parle d'infection lorsque la concentration en micro-organismes pathogènes atteint 10^6 organismes par gramme de tissu².

Le passage de la simple contamination à l'infection se traduit par une inflammation et présente les caractéristiques cliniques suivantes : fièvre, compte globulaire élevé, plaie chaude, érythémateuse, douloureuse au contact et purulente.

L'origine de la contamination peut être¹⁸ :

- Endogène : à partir de l'organisme humain. Les bactéries les plus impliquées sont *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ;
- Exogène : à partir d'objets contaminés ou d'êtres vivants environnant la plaie. La contamination est directe par des micro-organismes provenant de sources animées et indirecte par des micro-organismes provenant de sources inanimées.

Plusieurs facteurs peuvent favoriser l'infection bactérienne :

- La nature du micro-organisme : les bactéries les plus impliquées dans l'infection des plaies sont : *Staphylococcus aureus* (52%), streptocoques (52%), *clostridium sp.* (23%), enterobactéries (23%), bacilles Gram-négatif anaérobies (1.5%)²⁹ ;

Les plaies accidentelles sont en majorité infectées par *Staphylococcus aureus*, tandis que les plaies chirurgicales sont infectées principalement par la flore bactérienne endogène et par les bactéries en provenance du personnel hospitalier et de l'environnement contaminé du patient ;

- L'importance de l'inoculum : son augmentation accroît le risque d'infection ;
- La résistance locale et systémique de l'hôte : plus la résistance de l'hôte est faible, plus il est sujet aux infections des plaies cutanées ;
- Les maladies chroniques, l'alcoolisme, la cirrhose, le diabète mellitus et l'administration de stéroïdes ou de médicaments cytotoxiques favorisent l'infection des plaies.

Une plaie infectée peut également présenter plusieurs complications : cellulite, fasciite, ténosynovite, septicémie, ostéochondrite et ostéomyélite. La complication la plus commune est la septicémie où une colonisation bactérienne de la plaie est capable d'induire une réaction systémique minimale ou un syndrome de réponse inflammatoire systémique.

Une plaie accidentelle est exposée à un risque d'infection microbienne locale et à une septicémie résultant de l'immuno-suppression post-traumatique.

III. TRAITEMENT DES PLAIES CUTANÉES

1. La suture :

La suture a pour but de rétablir la continuité de la surface cutanée en rapprochant les bords d'une plaie, d'arrêter l'hémorragie et de réduire les risques d'infection. Elle s'effectue à l'aide de fils de suture naturels ou synthétiques³⁰.

1.1 Les fils de suture résorbables :

Les fils de suture résorbables se dégradent à l'intérieur de l'organisme sous l'effet des enzymes, sans avoir besoin d'être retirés après cicatrisation cutanée. Les fils les plus utilisés sont : le catgut, les fils de collagène, les fils d'acide polyglycolique.

1.2 Les fils de suture non-résorbables :

Les fils de suture non-résorbables doivent être retirés lorsque la cicatrisation est achevée. Les fils de suture non-résorbables les plus utilisés sont à base de coton, de nylon et de polyester.

2. Les traitements classiques :

2.1 Le débridement :

Le débridement des plaies contaminées vise à imiter et par la suite à accélérer le processus physiologique de débridement qui a lieu durant la phase inflammatoire de cicatrisation. Il consiste à enlever le tissu nécrosé et dévitalisé³¹.

On distingue deux types de débridement :

2.1.1 Le débridement sélectif :

Il consiste à éliminer le tissu nécrosé sans toucher au tissu sain. On distingue :

2.1.1.1 Le débridement enzymatique :

Il s'agit d'enzymes protéolytiques présentées sous la forme d'une pommade, capables de digérer les protéines du tissu nécrosé et d'en provoquer la liquéfaction. Les enzymes les plus impliquées sont : la fibrinolysine, la désoxyribonucléase, les enzymes produites par *Bacillus subtilis*, la papaïne, la trypsine, la streptokinase et la streptodornase³¹.

2.1.1.2 L'autolyse :

Il s'agit d'une auto-digestion du tissu dévitalisé, facilitée par l'application de pansements occlusifs³¹.

2.1.1.3 L'excision chirurgicale :

L'excision chirurgicale élimine complètement le tissu dévitalisé et la fibrose qui entoure la plaie. Il en résulte une plaie propre et saignante qui est laissée à granuler librement. L'injection dans la plaie d'anesthésique pourrait transférer des bactéries situées à sa surface vers l'intérieur et provoquer une infection. Il est préférable dans ce cas de procéder à une anesthésie générale³¹.

2.1.2 Le débridement non-sélectif :

Le débridement non-sélectif est capable d'enlever le tissu nécrosé et le tissu sain sans distinction. Il se fait à l'aide de l'un ou de l'autre des procédés mentionnés ci-dessous³¹.

2.1.2.1 Le débridement mécanique :

Il s'effectue à l'aide d'agents mécaniques tel que les hydrogels contenant des particules sphériques hydrophiles de dextranomère. Le dextranomère est un polymère obtenu à partir du dextran réticulé par l'épichlorhydrine dans des conditions contrôlées. Le résultat est une molécule tridimensionnelle constituée de polymères de glucose reliés entre eux par des liaisons intermoléculaires³². Le rôle du dextranomère consiste à absorber l'exsudat et à former une couche gélatineuse à la surface de la plaie. Quand le dextranomère est retiré, il emporte les débris tissulaires qui s'attachent à lui.

2.1.2.2 Les pansements débridants :

Les pansements dits « sec à sec » sont des pansements secs utilisés dans le but de débrider mécaniquement une plaie et d'absorber l'exsudat.

Les pansements dits « humide à sec » sont des pansements imbibés d'une solution d'antiseptique ou d'un médicament, destinés à être appliqués sur des plaies en cours de cicatrisation et faiblement nécrotiques³³.

Dans ce cas, un changement répétitif du pansement jusqu'à élimination du tissu nécrosé est à l'origine du débridement.

2.2 L'antibiothérapie :

L'antibiothérapie systémique est souvent utilisée dans le but d'éviter une extension probable de l'infection vers les tissus sains environnants. Contrairement aux antibiotiques administrés par voie topique, les antibiotiques administrés par voie systémique n'entrent pas en contact direct avec la plaie. Certains antibiotiques sont efficaces localement mais ils ne peuvent être administrés par

voie systémique à cause de leur toxicité³⁴. La néomycine, la framycétine et la bacitracine appartiennent à ce groupe³⁵.

2.3 L'hydrothérapie :

L'hydrothérapie vise à débrider le tissu nécrotique à l'aide d'un bain de solution tourbillonnante. Elle sert également à faciliter le retrait des pansements difficilement détachables de la surface des plaies et à nettoyer les contaminants et les résidus toxiques des différents agents incorporés dans la plaie. La solution d'irrigation peut contenir un agent anti-bactérien dont le rôle consiste à tuer les bactéries qui se retrouvent dans les plaies infectées³¹.

2.4 Les agents topiques :

2.4.1 Les agents nettoyants des plaies :

L'utilisation des agents nettoyants est essentielle dans le but d'éviter l'infection des plaies et d'accélérer la cicatrisation.

2.4.1.1 L'hypochlorite :

Les solutions d'hypochlorite réagissent intensément avec les groupements amines des protéines par une réaction de chloration, d'oxydation ou d'hydrolyse de la matière azotée. Cette réactivité avec les protéines confère aux hypochlorites leur propriété anti-microbienne. Une solution d'hypochlorite de sodium est fortement alcaline (pH11), elle est par conséquent irritante. Convenablement conservée, cette solution est stable pendant plusieurs mois, mais cette stabilité est considérablement réduite lorsque le pH tombe en dessous de 11. L'acide hypochlorique, forme active de l'hypochlorite de sodium, exerce une action anti-microbienne maximale à pH5.5. On a alors recours à l'utilisation des solutions tamponnées d'hypochlorite dont le pH est situé entre 5.5 et 11, dans le but de réduire l'effet irritant de la solution, d'assurer une bonne activité biologique et de renforcer sa stabilité chimique³⁶.

2.4.1.2 Autres nettoyeurs des plaies :

- Le peroxyde d'hydrogène : l'effervescence du peroxyde d'hydrogène provoque un nettoyage mécanique et un débridement non sélectif de la surface des plaies. Il possède une activité anti-bactérienne très limitée puisqu'il est rapidement dégradé par la catalase, enzyme présente dans tous les tissus vivants³⁶ ;
- La proflavine : la proflavine est bactériostatique vis-à-vis des bactéries Gram positif. Elle est appliquée sous forme de solution ou de crème eau dans huile³⁶ ;
- Le cétrimide : le cétrimide possède une activité bactéricide contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. Détergent et anti-bactérien, le cétrimide permet à la fois le nettoyage et la désinfection des plaies et des brûlures. Par contre, le cétrimide en solution faiblement concentrée possède un effet cytotoxique et cytostatique très marqué, ce qui limite son utilisation en tant qu'antiseptique de routine³⁶ ;
- La chlorhexidine : la forme de chlorhexidine la plus connue est le gluconate de chlorhexidine, active contre une large gamme de micro-organismes³⁶ ;
- Les solutions antiseptiques et les nettoyeurs micellisés : le peroxyde de benzoyle, l'acide benzoïque, l'acide malique, l'acide salicylique, le propylène glycol, le permanganate de potassium. Ces solutions sont capables de prévenir ou d'éradiquer les infections responsables du dégagement d'odeurs désagréables³⁷ ;
- La povidone-iode: c'est un agent anti-microbien puissant à large spectre d'activité. Son effet bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* se manifeste à la concentration de 0,001%. Cependant, son activité est réduite en présence de pus ou d'exsudat à cause de la liaison qui se crée entre l'iode, agent antiseptique actif de cette solution, et les protéines sériques³⁶.

Effets indésirables des nettoyeurs des plaies :

- On reproche aux hypochlorites leur toxicité parfois irréversible ;
- L'utilisation prolongée des antiseptiques et des antibiotiques locaux peut retarder la cicatrisation. Par conséquent, il est conseillé d'éviter leur application sur les plaies non-infectées, et de se servir dans ce cas d'une solution physiologique stérile de chlorure de sodium.

2.4.2 Les pommades bactéricides :

Les pommades bactéricides servent à prévenir l'infection des plaies. Elles sont à base de bacitracine, de sulfadiazine d'argent ou de nitrofurazone³¹.

2.5 Les pansements synthétiques :

Les pansements synthétiques participent activement à la cicatrisation d'une plaie. Ils protègent les plaies ouvertes ou fermées par les sutures contre les traumatismes qui risquent de retarder la cicatrisation. Ils protègent également les plaies contre la contamination bactérienne et immobilisent la peau qui l'entoure. Ceci a pour but de réduire le stress mécanique qui a lieu durant la synthèse et l'orientation du collagène³⁸.

2.5.1 Critères d'un pansement idéal :

Un pansement idéal qui vise une cicatrisation optimale³⁹ :

- Doit garder la peau humide ;
- Ne doit pas être infecté ;
- Ne doit pas libérer dans la plaie des particules, des fibres ou des composés chimiques toxiques ;
- Doit garder la peau à la température optimale de cicatrisation ;
- Ne doit pas endommager la plaie lors des renouvellements fréquents ;
- Doit maintenir la plaie à un pH optimal.

2.5.1.1 Le contrôle de l'hydratation :

Une pratique courante avant les années 50 consistait à maintenir les plaies à l'état sec afin de prévenir l'infection bactérienne. Les études de Winter⁴⁰ et de Hinman et al.⁴¹, ont démontré que la plaie guérit plus rapidement lorsqu'elle est maintenue hydratée. Une plaie desséchée conduit à la formation d'escarre qui n'est autre qu'un mélange d'exsudat desséché et de derme dévitalisé. Cette escarre à laquelle s'incorporent parfois des fibres du pansement constitue une barrière naturelle à la migration des cellules épidermiques, ce qui prolonge le temps de cicatrisation et induit une perte du tissu sain.

L'application d'un pansement occlusif empêche la formation d'escarre et favorise la migration rapide des cellules épidermiques dans le derme à travers l'exsudat qui se trouve à l'interface plaie-pansement. Un pansement occlusif ou semi-perméable protège aussi contre les effets secondaires de la déshydratation. Cette déshydratation menace la survie des cellules épidermiques, des follicules pileux et des glandes sudoripares qui sont situées à la base des plaies et qui facilitent une guérison rapide.

Le pansement absorbant semble être utile dans le traitement des plaies exsudantes. Il a pour rôle d'absorber l'exsudat, ce qui prévient la macération des plaies et par la suite leur infection. Les pansements absorbants sont utilisés comme pansements secondaires.

Certains pansements dont la capacité intrinsèque d'absorption est faible ou nulle sont utilisés dans le but de maintenir un taux d'hydratation relativement constant.

2.5.1.2 La perméabilité aux gaz :

L'oxygène atmosphérique est indispensable à la guérison des plaies parce qu'il favorise la phagocytose des bactéries par les macrophages et accélère la guérison. Pour cela, la perméabilité aux gaz est un pré-requis aux pansements chirurgicaux.

Par contre, l'hypoxie engendrée par l'utilisation d'un pansement imperméable stimule l'angiogénèse. L'hypoxie limitée favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la granulation tissulaire, ce qui accélère la guérison des plaies.

Le rôle de l'oxygène dans la cicatrisation est donc complexe. Il est équilibré et peut être considéré comme un élément important de sélection des pansements.

La perméabilité d'un pansement au dioxyde de carbone (CO₂) est aussi un élément important de sélection des pansements : une alcalose par perte de CO₂ pourrait se développer à la surface des plaies, ce qui retarderait la cicatrisation.

L'application d'un pansement occlusif simple aide à prévenir ou à réduire la perte en CO₂ afin de maintenir un pH légèrement plus acide aux environs de la plaie.

2.5.1.3 L'effet du pH :

Selon Wilson et *al.*⁴², une acidification prolongée de la surface de la lésion augmente le taux de cicatrisation. Pour le démontrer, une étude comparative a été menée entre une pommade émulsionnée tamponnée à pH6 et une présentation commerciale contenant à la fois les acide malique, benzoïque et salicylique (pH2.8). Après application sur un pied ulcéré, le matériel tamponné capable de baisser le pH pour une durée de 24 heures était nettement plus efficace que la pommade non tamponnée capable de baisser le pH pour une durée de 4 heures. L'acidification prolongée favorise la libération de l'oxygène à partir de l'oxyhémoglobine. Il en résulte une augmentation du taux de cicatrisation, par augmentation de la disponibilité en oxygène.

Les pansements qui réduisent directement ou indirectement le pH du fluide de la plaie peuvent prévenir l'infection. Ils créent un milieu favorable à la cicatrisation. Cette dernière s'installe plus rapidement que

lorsqu'on utilise des pansements capables d'augmenter le pH aux environs de la plaie.

2.5.1.4 La libération de particules toxiques et de particules de matières :

Les fibres libérées des pansements peuvent s'incorporer dans l'escarre desséchée ou dans le tissu granuleux. Elles peuvent interférer avec le processus normal de cicatrisation, affecter la qualité de la cicatrisation et provoquer la formation de chéloïdes. La présence de corps étrangers favorise l'infection de la plaie.

2.5.1.5 La faible adhérence :

À l'exception des films semi-perméables, des hydrogels et des minéraux hydro-actifs, la plupart des pansements ont tendance à adhérer à la surface des plaies desséchées. Quand le pansement est retiré, la jonction entre l'escarre et le tissu sous-jacent se rompt, ce qui endommage le tissu nouvellement formé.

2.5.1.6 L'étanchéité aux micro-organismes :

Le pansement doit assurer une barrière efficace contre les micro-organismes pathogènes. Il protège les plaies contre l'infection par les bactéries aérobies.

2.5.1.7 Les propriétés thermiques :

La température d'une plaie est un facteur de la cicatrisation. Elle est importante pour l'activité mitotique et celle des leucocytes, qui sont réduites particulièrement en dessous de 28°C. Le réchauffement d'une plaie cutanée varie selon le type de pansement utilisé³⁹.

La baisse de la température d'une plaie diminue la disponibilité de l'oxygène au niveau de la plaie. Ceci est dû à une baisse du taux de dissociation de l'oxyhémoglobine³⁹.

L'effet refroidissant provoqué par les pansements à base d'hydrogel réduit la douleur et l'inflammation.

2.5.2 Différentes sortes de pansements :

2.5.2.1 Les matériaux de contact primaire :

Les matériaux de contact primaire sont utilisés dans le but d'absorber l'exsudat. Ils sont à base de coton ou de fibres de viscose, convenablement couverts d'une gaze ou d'un textile non tissé³⁴.

Ces pansements ont tendance à adhérer à la surface de la plaie quand la production en exsudat diminue. Ils doivent être suffisamment poreux afin de permettre à l'exsudat et au sang de passer loin de la plaie et d'éviter la macération des tissus sous-jacents.

En général, les matériaux de contact primaire sont imprégnés à l'aide de paraffine dans le but de devenir moins adhésifs et de diminuer leur capacité de macérer les plaies fortement exsudantes.

On utilise souvent des pansements gras contenant des anesthésiques locaux, des sulfamides, des antibiotiques, des agents anti-microbiens, des vitamines et d'autres agents capables de promouvoir la cicatrisation et de prévenir l'infection. Bien que ces pansements soient considérés comme non adhérents, leur retrait ne se fait pas sans douleur.

D'autres pansements viennent substituer les pansements gras tels que la viscose et les pansements à base de polyuréthanes.

2.5.2.2 Les films semi-perméables :

Plusieurs matériaux sont impliqués dans la fabrication des membranes semi-perméables. L'utilisation des films de polyuréthane est la plus récente. Des films composites ont été aussi développés⁴³. Parmi ceux-ci, on distingue :

- Les films de polyuréthane enveloppés par un système acrylique adhésif ;

- La laine non tissée absorbante contenue entre un film de polyuréthane hydrophile et une couche adhésive au contact de la plaie ;

Ces films composites sont utilisés pour couvrir les plaies fortement exsudantes.

Propriétés physiques des films :

Les propriétés physiques des films ont une influence sur leur performance clinique⁴³.

- L'épaisseur du film: la perméabilité et l'extensibilité du film sont influencées par son épaisseur ;
- La perméabilité aux vapeurs : l'exsudat produit à la surface des plaies doit passer à travers le film sous forme de vapeur d'eau. Une accumulation des sécrétions sous le film peut altérer le processus de cicatrisation et irriter la peau ;
- La perméabilité aux gaz : un pansement doit être extrêmement perméable à l'oxygène afin de favoriser la migration des cellules épidermiques. La colonisation de la plaie par des bactéries cutanées pathogènes diminue la pression en oxygène, ce qui mène au détachement des cellules épidermiques.

La perméabilité au CO₂ est également importante. Un pansement très perméable permet au CO₂ d'être libéré dans l'environnement de la plaie devenu par conséquent plus alcalin ;

- La compatibilité avec les tissus : tout matériel mis au contact d'une plaie ne doit pas libérer d'agents toxiques et ne doit avoir aucun effet indésirable sur le processus de cicatrisation.

Les films semi-perméables se maintiennent en place. Transparents ou translucides, ils permettent un contrôle visuel des suintements excessifs qui sont drainés par légère rupture du film. Ces films ont aussi l'avantage de former une barrière efficace contre les bactéries qui

infectent la plaie. On pourrait même y incorporer des agents antimicrobiens.

Les films semi-perméables sont par contre non-absorbants, plus ou moins difficiles à manipuler et capables de provoquer la rupture de l'épithélium quand ils sont retirés de la plaie⁴⁴.

2.5.2.3 Les mousses semi-perméables :

Il s'agit d'un pansement présentant une face hydrophile exposée à la plaie et une face hydrophobe exposée à l'air⁴⁵. Cette structure donne aux mousses la propriété d'absorber l'exsudat des plaies tout en contrôlant l'évaporation. Il en résulte une réduction de la macération des plaies⁴⁶.

La valeur potentielle des pansements à base de mousse est reconnue depuis les années 70 avec l'innovation de Silastic™ et de Lyofoam™.

La mousse répond à plusieurs critères du pansement idéal⁴⁷ :

- C'est un bon isolant thermique ;
- Elle ne libère pas de particules ni de fibres ;
- Elle est facile à éliminer ;
- Elle assure une hydratation adéquate du contour des plaies ;
- Elle est perméable aux gaz ;
- Elle n'adhère pas aux plaies ;
- Elle est légère ;
- Elle est capable d'absorber de grands volumes d'exsudats.

Cependant, les mousses adhèrent aux plaies quand l'exsudat se dessèche⁴⁴.

2.5.2.4 Les alginates :

L'acide alginique est utilisé sous forme de sel calcique, associé parfois au sel de sodium dans le but d'augmenter le taux de formation de gel⁴⁸.

Les alginates utilisés dans le traitement des plaies sont mis sous forme de papier couvert d'une compresse absorbante. La fréquence des

changements varie selon la quantité d'exsudat produite et selon l'état de la plaie.

Les alginates possèdent plusieurs critères décrits dans le cas d'un pansement idéal. En plus, ils sont capables de se combiner à l'exsudat pour former un gel hydrophile qui maintient l'hydratation de l'interface pansement-plaie.

Les alginates sont absorbants et présentent donc un intérêt particulier dans le traitement des plaies suintantes. Ils sont hémostatiques et ne déclenchent pas de réactions d'hypersensibilité.

Pourtant, les alginates sont plus ou moins difficiles à retirer des plaies. Ils sont douloureux s'ils se dessèchent et ils laissent dégager une odeur désagréable⁴⁴.

2.5.2.5 Les hydrogels semi-perméables :

Les hydrogels sont constitués de polymères insolubles avec des sites hydrophiles qui interagissent avec des solutions aqueuses en absorbant et retenant des volumes importants d'eau.

Les pansements à base d'hydrogel sont répartis en deux groupes⁴⁹:

- Les pansements sans structure tridimensionnelle. Ils contiennent un hydrogel amorphe et sont destinés à être appliqués sur les plaies. Ces pansements absorbent l'exsudat, diminuent leur viscosité et ont tendance à prendre la forme de la plaie qu'ils recouvrent (figure 3).
- Les pansements constitués de réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles. Les hydrogels logent dans des compartiments de polyéthylène compris entre deux films en polyéthylène faciles à détacher. Ce type de pansement ne change pas sa forme physique mais gonfle en présence d'exsudat (figure 4).



Figure 3 : Hydrogel amorphe

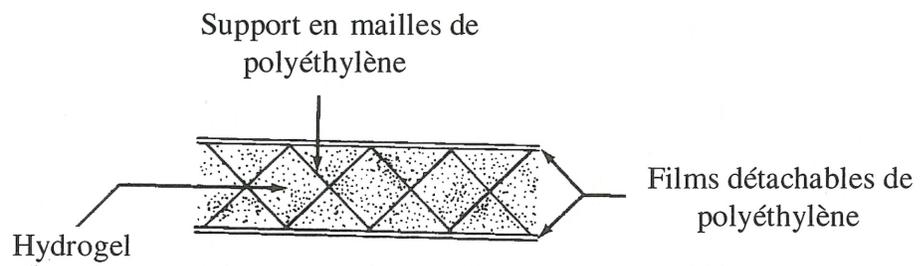


Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'un pansement d'hydrogel.

Les polymères utilisés dans la préparation des hydrogels peuvent être préparés à partir de matériaux synthétiques, semi-synthétiques ou d'un mélange des deux (exemple : copolymère d'oxyde de polyéthylène de haut poids moléculaire, d'agar et de polyacrylamide).

Les pansements à base d'hydrogel peuvent être appliqués et retirés sans douleur et traumatisme, parce qu'ils ne se dessèchent pas. Ces pansements réduisent aussi la douleur secondaire à la plaie, ce qui les rend tolérables par les patients. Ils sont absorbants et permettent le contrôle des plaies grâce à leur aspect transparent.

Les désavantages associés à l'utilisation des hydrogels sont⁴⁹ :

- La difficulté de les maintenir en place ;
- Le besoin de renouveler fréquemment les pansements ;
- Le dessèchement possible du pansement appliqué sur une plaie légèrement suintante ou la macération des plaies fortement suintantes ;
- Le coût élevé du traitement.

2.5.2.6 Les hydrocolloïdes :

Le terme « hydrocolloïde » désigne une famille de pansements constitués d'un gélifiant combiné à d'autres matériaux tels que les élastomères et les adhésifs⁵⁰. Fréquemment à base de carboxyméthylcellulose (CMC), les hydrocolloïdes peuvent contenir d'autres polysaccharides (guar, cellulose et xanthane de cellulose) ainsi que des protéines.

Les hydrocolloïdes se présentent sous forme de mousse flexible ou de plaques de film, couverts d'une couche d'hydrocolloïde, elle-même couverte d'un papier permettant la libération du produit.

La base peut se présenter aussi sous forme de granules ou de pâtes qu'on peut appliquer conjointement à un papier afin d'augmenter le pouvoir absorbant du système⁵⁰.

La majorité des études publiées sur l'utilisation clinique des hydrocolloïdes se rapporte à Granuflex™⁵¹. Elles démontrent que le taux de cicatrisation, le temps de cicatrisation ainsi que l'aspect de la cicatrice sont meilleurs, comparés aux cicatrices traitées à l'aide d'autres pansements.

Les hydrocolloïdes sont surtout utilisés dans le traitement de l'ulcère des pieds. Leur utilisation est facile et ils ont l'avantage de réduire la douleur et le délai de la cicatrisation, d'adhérer à la peau et d'empêcher l'évaporation de l'exsudat tout en maintenant la plaie hydratée.

Les problèmes majeurs liés à leur utilisation sont: l'odeur désagréable, la formation de gel liquéfié sous le pansement et parfois, la production d'une quantité excessive de tissu de granulation. En plus, ils sont opaques, ce qui empêche la détection du suintement⁴⁴.

2.5.2.7 Les saccharides :

Une variété de saccharides peut être utilisée dans le pansement des plaies³² :

- Le miel : L'utilisation du miel dans le traitement des plaies remonte au temps des égyptiens et demeure le remède le plus populaire des ulcères des pieds. Son pH aux alentours de 3.7 crée un environnement défavorable à la croissance bactérienne. Cependant, il a été démontré que le miel pur est capable de tuer ou d'inhiber la croissance d'une large gamme de bactéries, à l'exception de *Candida*. Sa pression osmotique élevée est responsable du drainage de l'eau en dehors du tissu périphérique, ce qui nettoie la plaie et réduit le risque d'œdème. Il pourrait être également utilisé comme source d'énergie et comme nutriment des cellules périphériques ;
- Le sucrose présenterait un certain intérêt particulier dans le traitement des plaies. Le sucrose en granules peut être utilisé en association avec la Povidone-Iode ou avec la teinture benzoïque ;

- Le sucre granulé, utilisé à 195 grammes dans 100 grammes d'eau provoque une inhibition complète de la croissance d'une large gamme de micro-organismes viables. Certaines études ont montré que la pression osmotique et le sucre partiellement dissous pourraient nuire aux plaies qui auront tendance à se déshydrater, ce qui augmente le délai de cicatrisation³² ;
- Les sphérules de polysaccharides : Les pansements commerciaux à base de polysaccharides transformés en sphérules ou en granules sont utilisés de la même façon que le sucre, mais différent par leur mode d'action : tandis que le sucre inhibe la croissance bactérienne, les sphérules à base de polysaccharides tel que le dextranome agissent en nettoyant les plaies et préviennent ainsi l'infection.

Les polysaccharides sont des pansements absorbants et antiseptiques, capables de débrider les plaies. Cependant, ces pansements sont difficiles à maintenir en place et à retirer des plaies. Ils peuvent dessécher le lit de la plaie et dégager une odeur désagréable⁴⁴.

2.5.2.8 Les pansements qui absorbent les odeurs :

Les plaies infectées produisent parfois une odeur désagréable et gênante. La façon la plus efficace de gérer cette odeur est d'éliminer l'infection. L'application d'antibiotiques par voie topique est parfois insuffisante et il est nécessaire dans ce cas d'utiliser un pansement qui absorbe l'odeur.

Un tissu de charbon activé obtenu à partir d'un tissu de cellulose adéquat est utilisé dans le but d'absorber l'odeur au niveau des plaies. Il est aussi capable d'adsorber les bactéries à sa surface et d'améliorer ainsi la cicatrisation des plaies³⁷.

2.5.3 Critères de sélection d'un pansement :

L'utilisation d'un pansement occlusif est controversée. Les pansements imperméables à la vapeur d'eau permettent la migration de l'épiderme à la surface originale de la plaie au lieu de la surface du derme, ce qui accélère la régénération de l'épithélium⁴⁶. Ils forment une barrière très efficace contre les contaminants. Ils sont capables d'apaiser la douleur en refroidissant directement la plaie couverte et en interférant avec l'acide arachidonique⁴⁴.

Les critères de sélection d'un pansement dépendent du type de la plaie à traiter⁵² :

- Les plaies sèches et nécrotiques nécessitent un pansement qui maintient la peau hydratée ;
- Les plaies couvertes d'une croûte nécessitent un pansement qui maintient la peau hydratée, qui absorbe les fluides et l'odeur et qui possède parfois des propriétés anti-microbiennes ;
- Les plaies propres et exsudantes nécessitent un pansement qui absorbe les fluides et les odeurs, qui assure l'isolation thermique de la plaie et qui est doté parfois de propriétés anti-microbiennes ;
- Les plaies faiblement exsudantes à sèches nécessitent un pansement qui maintient la peau hydratée, qui assure l'isolation thermique de la plaie et qui adhère faiblement à la peau.

Finalement, les pansements doivent être changés une ou deux fois par jour, dépendamment de la quantité d'exsudat produite. Avec le temps, ils peuvent être changés une fois par semaine⁴⁴.

2.6 Les pansements biologiques :

Les pansements biologiques sont constitués de tissu d'origine humaine ou animale à différents degrés.

Un des pansements biologiques utilisés est un composite d'une membrane semi-perméable et extrêmement mince de silicone, attachée à un tissu flexible en

nylon. Un mélange atoxique et hypoallergénique de peptides hautement purifiés dérivés du collagène du derme du porc est attaché à cette membrane élastique pour former une surface hydrophile et biocompatible. Ce pansement a une perméabilité aux vapeurs comparable à la peau humaine normale. Il est utilisé sur les plaies excisées et débridées et sur les greffes de peau contenant moins de 10^5 bactéries par gramme de tissu⁴⁵.

3. La stimulation électrique :

Le traitement des plaies par stimulation électrique est encore sous étude et a été exploité dans le traitement des plaies chroniques.

Le courant électrique employé peut être continu ou alternatif, à faible voltage ou à voltage élevé, à microampérage ou à milliampérage, monophasé ou biphasé.

La stimulation électrique a pour but d'améliorer la circulation sanguine au niveau cutané, ce qui favorise la cicatrisation des plaies⁵³. La stimulation électrique possède aussi un effet bactéricide direct et probablement indirect, par attraction des macrophages et des leucocytes vers le site infecté⁵⁴.

4. L'ultrason :

L'ultrason est efficace durant la phase précoce de l'inflammation aiguë. Les vibrations qu'il engendre provoquent la libération d'histamine par les mastocytes et les macrophages. L'ultrason provoque aussi la libération de médiateurs chimiques capables de stimuler les fibroblastes responsables de la production du collagène.

L'ultrason est capable d'accélérer la contraction des plaies quand il est appliqué durant les deux phases, inflammatoire et de prolifération, de la cicatrisation cutanée⁵⁵.

5. La lumière :

La lumière à différentes longueurs d'onde peut affecter la cicatrisation des plaies :

- Le laser de faible énergie présente un effet biostimulateur et photochimique. Le laser à l'hélium-néon est un agent physique qui favorise la cicatrisation du derme par stimulation de la synthèse du collagène ;
- Les rayons ultra-violetes présentent un effet bactériostatique capable de tuer les bactéries qui viennent infecter la plaie ;
- Les rayons infra-rouges sont capables de réchauffer la plaie et de provoquer la vasodilatation de la région exposée aux rayonnements. Cet effet aurait pour but d'augmenter l'apport en cellules inflammatoires et de favoriser la cicatrisation des plaies⁵⁶.

6. L'oxygène hyperbare :

L'oxygène hyperbare joue un faible rôle dans le traitement des plaies superficielles et légèrement infectées. L'oxygène employé en tant qu'adjuvant thérapeutique à une pression supérieure à une atmosphère augmente la pression partielle en oxygène au niveau vasculaire. Il rétablit le gradient en oxygène entre les tissus et les capillaires, ce qui favorise la diffusion de l'oxygène dans la région hypoxique.

L'oxygène hyperbare favorise la migration des fibroblastes dans la plaie et la production du collagène. Un traitement intermittent favorise la revascularisation des plaies et augmente le flux sanguin capillaire.

L'oxygène hyperbare possède aussi un effet bactéricide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et des bactéries anaérobies sensibles à une pression élevée en oxygène¹⁸.

IV. LE CHITOSAN

1. Généralités :

1.1 La chitine et le chitosan:

Les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux polysaccharides, polymères naturels et matériaux de structure, afin de mieux comprendre leurs propriétés et leurs fonctions biologiques.

Plusieurs types de polysaccharides sont produits dans la nature, le polysaccharide le plus abondant étant la cellulose, suivie de la chitine. Produite en quantités énormes (10^{10} - 10^{11} tonnes/an), la chitine demeure une biomasse peu utilisable sans traitement de sa structure.

La chitine est un polysaccharide aminé ayant des groupements acétamide au niveau du carbone en position 2 (Figure 5). En 1859, Rouget⁵⁷ fut le premier à désacétyler la chitine pour la transformer en chitosan ayant des groupements amine libres.

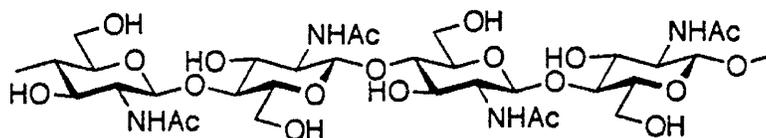


Figure 5 : Formule structurale de la chitine

1.2 Sources naturelles :

La chitine se trouve largement dans la nature. L'exosquelette des crustacés (20-50 % du poids sec) produit de rejet de l'industrie des pêches et les insectes demeurent la meilleure source de chitosan. La chitine est produite aussi par les algues et les champignons.

Le chitosan lui-même est produit par certains champignons et peut être isolé de leur paroi cellulaire. Il est considéré comme le produit de l'action de la chitine désacétylase sur la chitine⁵⁸.

2. Dénomination et formule structurale :

C'est un copolymère linéaire de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glycopyranose (N-acétyl glucosamine) et de 2-amino-2-désoxy- β -D-glycopyranose (glucosamine), reliés par une liaison du type $\beta(1-4)$ ⁵⁸ (Figure 6).

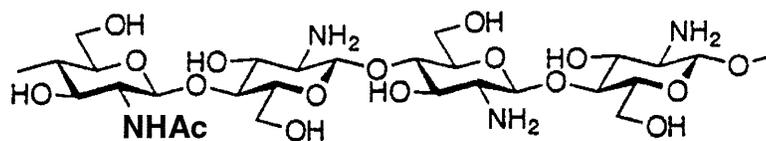


Figure 6 : Formule structurale du chitosan

3. Synthèse chimique du chitosan :

La synthèse chimique du chitosan se fait par désacétylation de la chitine à l'aide d'une solution basique à la concentration de 40-50 %, à une température située entre 120 et 160 °C. Le degré d'acétylation sous ces conditions est compris entre 15% et 30 %⁵⁸.

4. Propriétés physico-chimiques :

Le chitosan possède une structure cristalline. Il est hydrophile et capable de gonfler dans l'eau tout en étant insoluble dans l'eau. Le chitosan est soluble dans des solutions acides faibles à partir de l'acide acétique, de l'acide formique, de l'acide lactique et de l'acide nitrique. Le chitosan est insoluble dans l'acide sulfurique et l'acide phosphorique. Il est également insoluble dans la majorité des solvants organiques⁵⁸, à l'exception du mélange DMF-N₂O₄ et du N₂O₄ dans une proportion de 3 pour 1⁵⁹.

5. Modifications chimiques du chitosan :

Le chitosan peut être chimiquement modifié au niveau du groupement amine primaire en C₂ et/ou au niveau de la fonction hydroxyl du groupement hydroxyméthyl en C₅.

5.1 Acylation :

La réaction d'acylation du chitosan s'effectue à l'aide d'anhydrides d'acides carboxyliques. Cette réaction est rapide et facile au niveau de la fonction amine primaire en C₂, elle est plus lente au niveau de la fonction hydroxyl⁵⁸.

La N-alkylation du chitosan s'effectue en milieu acide et conduit à la formation d'un milieu réactionnel généralement plus visqueux par réduction de la solubilité. Des réactions d'hydroxyalkylation du chitosan sont possibles⁵⁸.

Un cas particulier d'alkylation consiste à préparer des dérivés aliphatiques du chitosan selon la procédure modifiée de Hirano⁶⁰. Cette procédure consiste à solubiliser 5 g de chitosan dans 200 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 10% tout en maintenant l'agitation pendant 12 heures à la température ambiante. Un volume de 300 ml de méthanol est ajouté à la solution visqueuse de chitosan, et après 15 minutes, un volume donné d'anhydride d'acide aliphatique approprié est ajouté. Le tout est agité pendant 12 heures à la température ambiante. La nature et le volume d'anhydride nécessaires sont déterminés selon la nature du dérivé à produire et le degré de substitution désiré⁶¹.

5.2 Carboxylation :

Les réactions de carboxylation sont possibles grâce aux acides carboxyliques comprenant des groupements aldéhyde ou cétone.

Les acides carboxyliques cycliques provoquent la carboxyalkylation du chitosan au niveau du groupement amine⁵⁸.

5.3 Sulfatation :

La réaction de sulfatation du chitosan conduit à des produits dont la structure est identique à celle de l'héparine. Elle s'effectue au niveau des deux groupements amine et hydroxyl⁵⁸.

5.4 Formation de sels quaternaires :

La formation de sels quaternaires est possible grâce au groupement amine primaire en C₂, qui se lie aux acides organiques et inorganiques par une liaison du type imine⁵⁸.

6. Applications :

Le chitosan et ses dérivés ont de nombreuses applications pharmaceutiques, médicales, industrielles et agronomiques.

6.1 Applications en pharmacie :

6.1.1 Agent facilitant l'absorption des médicaments :

Le chitosan est exploité en tant qu'agent facilitant l'absorption des médicaments. Il semble augmenter la perméabilité cellulaire par mucoadhésion et en affectant les voies paracellulaires et intracellulaires de pénétration à travers l'épithélium. Le chitosan exerce un effet mineur et réversible sur la fonction et la morphologie de l'épithélium, ce qui rend son utilisation possible dans les systèmes de libération des médicaments au niveau de la muqueuse buccale, gastro-intestinale, nasale, oculaire, au niveau parentéral et en thérapie génique⁶².

6.1.2 Matrice dans les systèmes de libération contrôlée des médicaments :

Des complexes macromoléculaires de chitosan sous forme de comprimés ont fait l'objet de plusieurs études de libération contrôlée des médicaments. Le contrôle de la libération du médicament à travers ces complexes dépend des propriétés de gélification des polymères⁶³.

6.2 Applications en médecine :

Le chitosan a démontré des activités biologiques, pharmacologiques et physiologiques variées. Il est doté d'une activité immobilisatrice cellulaire, immuno-stimulatrice⁶⁴ et promotrice de la cicatrisation cutanée.

6.2.1 L'immuno-stimulation :

Le chitosan est un des dérivés de la chitine dotés de propriétés stimulantes de l'immunité. Cette activité immuno-stimulatrice est due en particulier à l'activation des macrophages qui, grâce aux agents chimiotactiques et aux médiateurs chimiques qu'ils produisent, sont capables de stimuler la prolifération des fibroblastes, de produire du collagène et de moduler les cellules endothéliales. L'activation cellulaire ainsi que les propriétés immuno-adjuvantes dues au chitosan renforcent la défense de l'organisme contre l'infection et peuvent même inhiber la formation de tumeurs⁶⁵.

6.2.2 L'immobilisation cellulaire :

Le chitosan et ses dérivés sont impliqués dans le processus d'immobilisation cellulaire. Cette activité biologique leur confère des propriétés anti-tumorales, anti-microbiennes et hémostatiques.

6.2.2.1 Activité anti-tumorale :

On sait déjà qu'une molécule de chitosan est constituée de monomères de glucosamine et de N-acétyl glucosamine. On considère donc par analogie à la glucosamine infusée chez des patients, que le chitosan

possède une toxicité sélective *in vitro* envers les tumeurs et augmente l'activité des lymphocytes T Natural Killer (NK)⁶⁵.

6.2.2.2 Activité anti-microbienne :

Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de l'activité anti-microbienne du chitosan :

- Le premier mécanisme serait dû à son pouvoir agglutinant des cellules microbiennes. L'attraction électrostatique responsable de l'immobilisation des cellules microbiennes, c'est-à-dire la nature polycationique du chitosan qui interfère avec les résidus chargés négativement présents à la surface des cellules, finit par altérer la perméabilité cellulaire^{66, 67} ;
- L'activité sélective du chitosan pourrait être due aux différences de densité des récepteurs spécifiques au N-acétyl glucosamine à la surface de la membrane des cellules microbiennes. La structure du N-acétyl glucosamine de la molécule de chitosan est reconnue par ces récepteurs, ce qui permet la fixation du chitosan et l'immobilisation des cellules microbiennes⁶⁵ ;
- Un autre mécanisme d'action du chitosan serait dû à la liaison du chitosan à l'ADN des micro-organismes afin d'interférer avec l'ARNm et la synthèse protéique⁶⁸.

Les dérivés lactique et hydroglutamique du chitosan possèdent une activité anti-microbienne⁶⁸. Il en est de même pour le N-carboxybutyl chitosan qui pourrait être utilisé en tant que pansement des plaies⁶⁹.

Facteurs qui influencent l'activité anti-microbienne du chitosan :

Les facteurs qui influencent l'activité anti-microbienne du chitosan sont⁷⁰ :

- La source du chitosan : il semble que le chitosan provenant des crustacés agit sur les micro-organismes par plusieurs mécanismes d'action ;

- La forme du chitosan : une solution acide de chitosan possède une activité anti-microbienne supérieure à la poudre de chitosan ;
- Le degré d'acétylation : l'inhibition de la croissance des micro-organismes est supérieure lorsque le degré d'acétylation du chitosan est élevé ;
- Le degré de polymérisation : chez certains micro-organismes, le chitosan à faible degré de polymérisation bloque la perméabilité de la membrane cellulaire aux substances nutritives ;
- Le pH du milieu : le chitosan possède une activité anti-microbienne optimale à un pH supérieur ou égal à 5.

Le dérivé N-carboxyméthylé est plus hydrosoluble que le chitosan et possède par conséquent des propriétés de chélation supérieures. Son efficacité anti-microbienne dans un intervalle de pH plus grand résulte de sa propriété amphiphile.

6.2.2.3 Activité hémostatique :

Grâce à sa structure polymérisée et à sa capacité à s'enchevêtrer, le chitosan piège les hématies. Ceci mène à la formation d'un coagulum hémostatique. Ce pouvoir hémostatique dépend de la structure et du poids moléculaire du chitosan⁷¹.

Le pouvoir hémostatique trouve son application dans le scellage des sites de ponction artériels à l'aide du chitosan microcristallin.

Par contre, une activité anti-thrombogénique est attribuée à des complexes macromoléculaires constitués de chitosan et de l'une des molécules suivantes : héparine, sulfate de dextrane, carboxyméthyl dextrane à bas poids moléculaire, carboxyméthyl dextrane à haut poids moléculaire et carboxyméthylcellulose. Le mécanisme de suppression de la coagulation est dû aux groupements carboxyles chargés négativement dans le sang à pH élevé (pH7.4). Ces charges potentialisent la force de répulsion entre les hématies dont la surface est chargée négativement. Le pouvoir

anti-thrombogénique est influencé également par l'hydrophobie et l'électronégativité de surface des complexes⁶³.

6.2.3 L'activité cicatrisante :

La chitine désacétylée intervient dans la cicatrisation des plaies selon différents mécanismes :

- Le chitosan stimule les macrophages qui s'activent et libèrent des lysozymes (Figure 7)⁶⁵. Le lysozyme, normalement produit par les macrophages, hydrolyse le chitosan modifié en oligomères. Ces oligomères activent les macrophages qui produisent l'Interféron, le Tumor Necrosis Factor (TNF) et l'Interleukine-1 (IL-1). Les macrophages activés produisent également le N-acétyl-bêta-D-glucosaminidase qui catalyse la production de D-glucosamine, de N-acétyl glucosamine et des glucosamines substituées des oligomères. Ces glycosamines sont livrées aux fibroblastes qui prolifèrent sous l'effet de l'interleukine-1. Elles sont incorporées dans l'hyaluronate et les glycosaminoglycans qui organisent la déposition ordonnée du collagène, également influencée par les oligomères ;
- Le glucosaminoglycan (NAG), sous-unité répétitive des dérivés de la chitine dont fait partie le chitosan, est un composant majeur du derme et sa présence est essentielle à la formation du tissu de cicatrisation. La dégradation du chitosan par les lysozymes normalement retrouvés dans le fluide d'une plaie permet la libération des molécules de NAG au sein d'une plaie. La NAG existe en large quantité dans les glycoprotéines isolées durant la phase précoce de cicatrisation et joue un rôle important, donnant structure et forme au collagène nouvellement formé dans le tissu de granulation, ce qui influencerait les propriétés mécaniques de la cicatrice⁷¹.

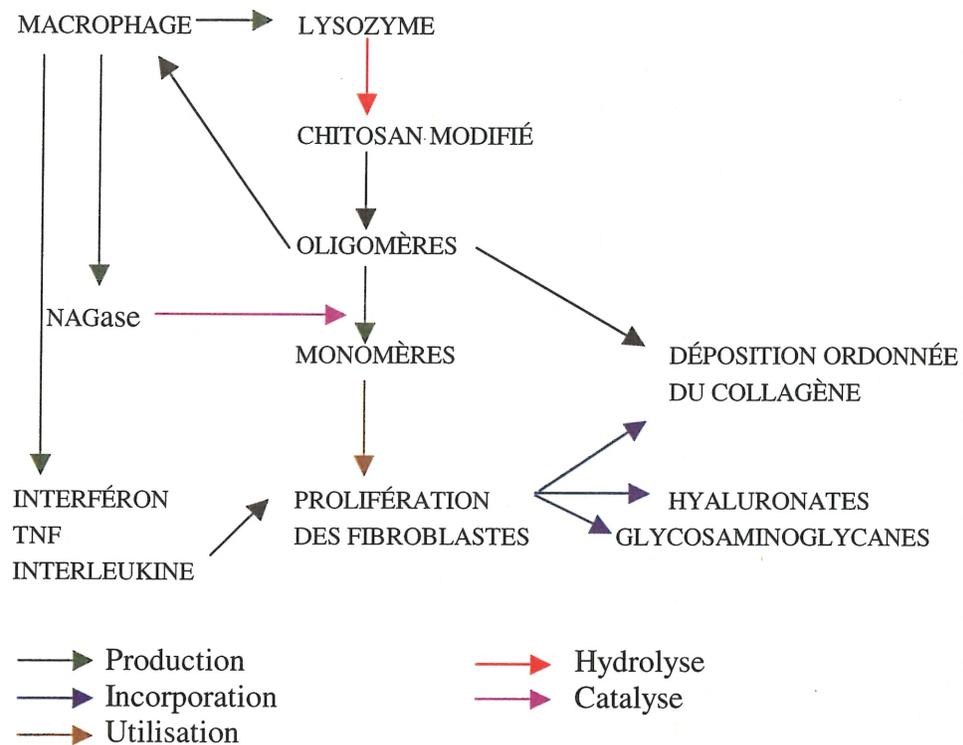


Figure 7 : Rôle des lysozymes dans la cicatrisation cutanée

Le chitosan est impliqué aussi dans le processus de régénération des ostéoblastes et des chondrocytes⁷².

La glucosamine exogène stimule la synthèse des protéoglycans et possède une activité trophique au niveau du cartilage de conjugaison. Elle favorise la formation des esters de sulfate au niveau de la chondroïtine sulfate, ce qui compense la dégénérescence cartilagineuse observée chez les personnes atteintes d'arthrose⁶⁵.

L'hydrogel à base de chitosan combiné à la polyvinyl pyrrolidone peut être utilisé en tant qu'isolant immunologique dans les transplantations d'îlots de Langerhans afin d'épargner à l'hôte les réponses immunologiques indésirables⁷³.

Des études effectuées à l'aide du dérivé N,O-carboxyméthylé ont montré son efficacité dans la prévention des adhésions post-chirurgicales. Le mécanisme demeure cependant inconnu⁷⁴.

Le dérivé N-carboxybutylé fut aussi exploité dans le traitement des plaies et semble influencer positivement le processus de cicatrisation⁷⁵.

6.3 Autres applications :

6.3.1 En dentisterie :

Le chitosan associé à l'hydroxyapatite apparaît comme un ciment prometteur en endodontie et en dentisterie restauratrice⁷⁶.

6.3.2 Analyse et séparation :

Le chitosan et le N-triméthyl chitosan forment avec les polyanions de l'eau un complexe polyionique utilisé pour titrer les ions polymériques.

Le chitosan est utilisé aussi comme adsorbant dans la chromatographie à couche mince afin de séparer plusieurs composés organiques y compris les acides aminés⁷⁷.

Les membranes de chitosan préparées en traitant une solution acétique de chitosan à l'aide d'une base servent au transport actif des ions chlorure à partir d'une solution acide vers une solution basique⁷⁸ et servent aussi à la concentration de l'éthanol⁷⁹.

L'introduction de certains groupements actifs sur la molécule de chitosan permet le développement d'affinités spécifiques vis-à-vis de certaines enzymes telle que l'inhibiteur de la trypsine-soja (TSI)⁸⁰. La modification apportée à la molécule de chitosan permet sa fixation sur le TSI sur lequel se fixe ensuite la trypsine. Le chitosan précipite par alcalinisation du milieu, entraînant avec lui la trypsine qui sera isolée après dissociation du complexe TSI-chitosan.

6.3.3 En agriculture :

Le chitosan est employé comme additif dans les engrais liquides composés⁶² et comme agent de récupération des métaux. Il possède des propriétés anti-virales, anti-bactériennes et anti-fongiques remarquables qui protègent les plantes contre l'invasion par certaines bactéries et champignons et préviennent ainsi certaines maladies. Cette activité est favorisée par un faible poids moléculaire et par un degré de désacétylation élevé⁵⁸.

Le N-carboxyméthyl chitosan inhibe la croissance et la libération des toxines produites par *Aspergillus flavus* et par *Aspergillus parasiticus*⁸¹.

6.3.4 Traitement des eaux usées :

Le chitosan est soluble dans une solution diluée d'acide organique afin de donner une solution polycationique utilisée dans la coagulation des eaux usées. Le chitosan a l'avantage d'être moins toxique que les polycations synthétiques⁸⁰ et d'être biodégradable.

Le chitosan est capable aussi de chélater les cations métalliques tels que le mercure, le plomb, le cadmium, le fer, le nickel et le zinc.

6.3.5 Industrie cosmétique :

Les dérivés hydrosolubles sont capables de former un film par interaction de leur surface polycationique avec la surface chargée négativement de la peau et des cheveux. Ce film forme une couche protectrice contre l'effet nuisible de la sécheresse, du soleil... Cette propriété est recherchée dans les lotions, les crèmes, les vaporisateurs pour cheveux et les shampooings⁵⁸.

6.3.6 Industrie alimentaire :

Le chitosan est utile dans le traitement des aliments. Il peut être utilisé comme agent épaississant, comme additif alimentaire mais aussi comme préservatif grâce à ses propriétés anti-microbiennes.

Les esters d'acides aliphatiques sont employés comme émulsifiants⁵⁸.

Un mélange de chitooligosaccharides préparé par digestion du chitosan à l'aide de la cellulase possède des propriétés anti-bactériennes permettant son utilisation dans la préservation du lait⁸¹.

6.3.7 En diététique :

Le chitosan est doté de propriétés hypolipémiantes⁸² dues à son activité au niveau de l'absorption et du métabolisme des lipides⁸³. On a remarqué une baisse du cholestérol plasmatique chez des rats mâles soumis à une diète riche en cholestérol, ceci après administration de préparations à 2% et à 5 % de chitosan⁸⁴.

Nauss et *al.*⁸⁵ ont démontré que le chitosan est un puissant agent séquestrant des sels biliaires. Il bloque les sels biliaires, principalement par phénomène d'interaction ionique, et influence ainsi l'absorption des lipides au niveau du tractus gastro-intestinal.

6.3.8 En médecine vétérinaire :

L'efficacité du chitosan dans le traitement des plaies et des affections qui touchent les sabots des ruminants a été évaluée à l'aide d'une étude comparative entre une solution à 1% de chitosan administrée par nébulisation et la même solution combinée à l'azulane à 10%⁸⁶. Les expérimentateurs ont signalé un effet positif du chitosan sur la granulation, sur la cicatrisation rapide et sur la création de l'épiderme chez les agneaux et les moutons d'expérimentation, sans que ces traitements soient plus efficaces que les traitements classiques.

7. Formes physiques du chitosan et/ou des dérivés du chitosan :

Le tableau I résume les différentes formes pharmaceutiques du chitosan ou de l'un de ses dérivés, développées pour applications diverses⁷¹.

Forme physique	Applications
Solution	Agent bactériostatique. Agent hémostatique. Cosmétique.
Gel	Véhicule dans les systèmes de libération contrôlée des médicaments.
Poudre	Poudre de lubrification de l'intérieur des gants de chirurgie. Immobilisation enzymatique Traitement des plaies ⁸⁷ .
Film/membrane	Membrane de dialyse. Lentilles de contact. Pansement des plaies.
Éponge	Agents hémostatiques muqueux. Pansement des plaies.
Micelles	Matériaux hypocholesterolémiants. Agents anti-gastrites Agents anti-bilirubinémie Agents anti-coagulants
Microparticules pH-sensibles, Nanoparticules, Liposomes ⁶²	Véhicule dans les systèmes de libération des médicaments

Tableau I : Formes physiques correspondant aux différentes applications du chitosan ou de l'un de ses dérivés.

V. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le chitosan est impliqué directement et indirectement dans le traitement des plaies cutanées. Il agit positivement sur la cicatrisation grâce à ses propriétés cicatrisantes, et l'améliore en inhibant la prolifération microbienne au niveau de la plaie. Certains de ses dérivés ont été étudiés pour ces mêmes propriétés et permettent, grâce aux modifications qu'engendre la dérivatisation, d'accentuer les activités cicatrisante et anti-microbienne.

Le rôle que joue le chitosan dans la cicatrisation des plaies pourrait être influencé par le degré d'acétylation du chitosan, par le groupement substitutif qui vient se greffer sur la chaîne polymérique, par le degré de substitution pour le même dérivé du chitosan ainsi que par la forme galénique sous laquelle il est présenté.

Le chitosan utilisé dans le traitement des plaies existe sous plusieurs formes galéniques : éponge, film ou membrane. Cependant, une forme galénique particulièrement intéressante en tant que pansement des plaies a été développée à partir de la chitine. Les fines fibres de chitine dispersées à partir d'une solution contenant la poudre blanche purifiée par décalcification et déprotéinisation des carapaces des crustacés ont été dispersées dans l'eau à l'aide d'un matériau d'enchevêtrement. La couche obtenue après élimination de l'eau a été comprimée et séchée⁸⁸. Des « fibrilles » de chitosan ont été obtenues en faisant subir à une solution acide de chitosan, une force de cisaillement dans un bain coagulant ou anti-solvant capable de maintenir un haut degré d'orientation moléculaire. La taille des « fibrilles » dépend des conditions de cisaillement lors de la coagulation, et il est possible de procéder à partir de ces fibrilles à la préparation de feuillets de chitosan d'après les procédures de fabrication du papier adoptées⁸⁹.

À partir de toutes les données qui ont été évoquées dans la littérature et de celles mentionnées ci-dessus, il est proposé dans cette étude de développer une forme galénique à application topique à partir des dérivés alkylés du chitosan. Pour y parvenir, il nous faut passer par plusieurs étapes dont la première est la synthèse des dérivés à partir du chitosan de poids moléculaire égal à 70 000 et à 15% de degré d'acétylation. En continuité avec d'autres études effectuées au sein de nos laboratoires, les dérivés qui feront l'objet de l'étude sont les dérivés acétique, butyrique et caproïque. Ensuite, il nous faudra choisir le degré de substitution du chitosan dans le but d'étudier son effet sur la cicatrisation des plaies.

Une étape de formulation galénique fera suite à l'étape de synthèse chimique. Elle consistera à préparer des fibres de chacun de ces dérivés en modifiant certains procédés. Les fibres ainsi préparées permettront de développer des pellicules de N-acétyl, N-butyryl ou N-caproyl chitosan.

Une dernière étape sera d'évaluer *in vitro* l'activité anti-microbienne de ces dérivés afin de prédire leur effet anti-bactérien qui empêcherait l'infection des plaies et favoriserait la cicatrisation cutanée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. MATÉRIEL

1. Réactifs utilisés :

Tous les produits cités dans cette partie ont une qualité « réactif », sauf indication contraire :

- Chitosan 70 000 daltons à 15% degré d'acétylation (Fluka Biochemika, lot 334707/1 794) ;
- Acide acétique glacial (Sigma, lot 69H3424) ;
- Méthanol (Aldrich, lot 01833BI) ;
- Anhydride acétique (Aldrich, lot 07722CI) ;
- Anhydride butyrique (Aldrich, lot 04315BQ) ;
- Anhydride caproïque (Aldrich, lot 09320MS) ;
- Diéthylamine (Sigma, Lot 39H1112) ;
- Alcool isopropylique (Sigma, lot 10K3663) ;
- Ether éthylique (Aldrich, lot PU11365JU) ;
- Glycérol (Laboratoires Denis Giroux, Lot 2583) ;
- Acide-d1 acétique-d3 (Aldrich, lot 10807EZ) ;
- Oxyde de deutérium (MSD isotopes, lot 2498-N) ;
- Milieu de culture liquide Mueller Hinton (Difco) ;
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ;
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ;

2. Appareillage :

- Spectromètre à résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) du type Bruker AMX-300 (300 MHz) ;
- Agitateur mécanique en hélice type Cafcano ;
- Centrifugeuse (IEC Centra-7) ;
- Presse hydraulique du type Carver ;
- Spectrophotomètre UV-visible ;
- Microscope optique type Leica, relié à une caméra couleur Pulnix (TMC-312) ;
- NanoScope III Dimension 3100 AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) ;
- Compresses de gaze ;
- Tamis 200 « mesh » ;
- Filtre sous vide Büchner ;
- Papier filtre Whatman # 1 ;
- Tissu en polyester ;
- Boîte de Pétri ;
- Gélose TSA (Difco) ;
- Filtre Millipore à 0.45 μm .

II. MÉTHODES

1. Purification du chitosan :

Le chitosan tel qu'il est livré par le fournisseur Fluka Biochemika contient 1% de produits insolubles et une quantité de cendres inférieure à 2%. Le procédé utilisé pour la purification est celui décrit par John Doczi⁹⁰. Il consiste à mélanger 16 g de chitosan avec 88 ml d'acide acétique 1N. La solution visqueuse obtenue est diluée avec 500 ml d'eau, chauffée à une température située entre 50 et 55°C pendant 20 minutes et filtrée à travers une gaze afin d'éliminer toutes les particules solides insolubles. Le volume de la solution filtrée est ajusté à 640 ml avec de l'eau distillée.

Un volume de 560 ml d'une solution aqueuse de salicylate de sodium à 10% est ajouté à la solution précédente de chitosan. Le mélange des deux solutions est chauffé à 50°C et agité à l'aide d'un agitateur mécanique à hélice jusqu'à obtention d'une solution claire, puis placé dans une chambre froide à 4°C toute la nuit sous agitation continue. Le précipité formé est séparé par centrifugation ($\Omega=6000$, $t=30$ min, $T=5^\circ\text{C}$), puis dissous dans un minimum d'eau. La solution obtenue est filtrée à travers une gaze, son pH est ajusté entre 8 et 9 à l'aide d'une solution méthanolique de diéthylamine 2N. Au voisinage de ces valeurs de pH, le chitosan précipite et il est récupéré par filtration sous vide en utilisant un papier filtre Whatman.

Le précipité est lavé trois fois avec du méthanol chaud jusqu'à disparition complète de toute trace de salicylate de sodium (Test d'identification du salicylate, USP XXII), puis lavé 2 fois avec l'éther éthylique anhydre et séché à 70°C sous vide.

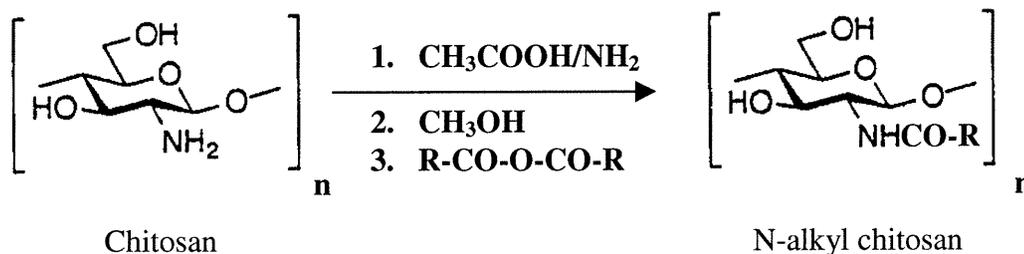
Les résultats expérimentaux ont montré que la purification du chitosan selon le procédé de Doczi⁹⁰ engendre une perte importante de la substance mère, soit environ de 50%, ce qui affecte le rendement final en chitosan purifié. La purification n'élimine pas la totalité des impuretés insolubles contenues dans le chitosan commercial et crée des impuretés dues au matériel utilisé.

Ces observations ont rendu possible l'utilisation du chitosan tel qu'il est fourni par le fabricant, sans avoir à le purifier. Toutefois, une filtration de la solution acétique diluée des dérivés du chitosan à travers une gaze, effectuée avant de procéder à la formation des fibres, permet d'éliminer les impuretés insolubles.

2. Synthèse des dérivés alkylés du chitosan :

La synthèse des dérivés alkylés se fait selon la procédure modifiée de Hirano⁶⁰. Elle consiste à solubiliser 5 g de chitosan dans 200 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 10% tout en maintenant l'agitation pendant 12 heures à la température ambiante. Un volume de 300 ml de méthanol est ajouté à la solution visqueuse de chitosan. Après 15 minutes, un volume donné d'anhydride d'acide aliphatique approprié est ajouté et le tout est agité pendant 12 heures à la température ambiante. La nature et le volume nécessaires sont établis selon le type de dérivé à produire et le degré de substitution désiré⁶¹.

La réaction générale de synthèse est la suivante :



Avec R= CH₃- pour le dérivé acétique
 CH₃(CH₂)₂- pour le dérivé butyrique
 CH₃(CH₂)₃- pour le dérivé caproïque

2.1 Détermination du degré de substitution (d.d.s.):

Le degré de substitution dépend du nombre de millilitres d'anhydride d'acide utilisé dans la réaction de synthèse. Le tableau II résume les volumes nécessaires à ajouter au milieu réactionnel constitué de 5 g de chitosan solubilisés dans 200 ml d'acide acétique à 10%, auxquels on ajoute 300 ml d'alcool méthylique⁶¹.

Degré de substitution (%)	Volume nécessaire d'anhydride (ml)		
	Anhydride acétique	Anhydride butyrique	Anhydride caproïque
20	0.5	0.85	1.2
50	1.23	2.2	3
80	2	3.4	4.8
100	>2.5	>4.3	>6

Tableau II: Volume d'anhydride correspondant au degré de substitution.

Le choix de synthétiser des dérivés à 20% et à 80% de substitution, a été fait dans le but de comparer un dérivé à faible degré de substitution à un autre dérivé dont le degré de substitution est élevé, et voir si le passage de l'un à l'autre affecte l'activité microbiologique des différents dérivés.

2.2 Validation du degré de substitution :

La validation du d.d.s. est faite à l'aide de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ¹H). Les spectres ont été enregistrés sur un appareil Bruker AMX-300 (300 MHz) à 25°C. Les solvants utilisés sont l'oxyde de deutérium (D₂O) et l'acide acétique deutéré (CD₃COOD). Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm).

Le degré de substitution est défini par le rapport des intensités des signaux des groupements méthyle de la chaîne à substituer et méthylène de l'unité glucosamine⁹¹.

Exemple de validation du d.d.s. du dérivé N-butyryl chitosan :

La validation du degré de substitution a été largement développée dans d'autres études effectuées au sein de nos laboratoires⁹¹. Dans ce travail, un exemple de la validation du degré de substitution a été mené à l'aide du N-butyryl chitosan. Le dérivé butyrique à 100% de substitution est préparé en faisant réagir un volume supérieur à 4.3 ml d'anhydride butyrique avec 5 g de chitosan. À partir du spectre RMN du proton (¹H), on détermine le rapport suivant :

$$R_1 = \frac{\text{Intensité du pic CH}_3 (\delta=0.90)}{\text{Intensité du pic CH}_2 (\delta=2.27)}$$

Il en est de même pour le dérivé butyrique partiellement substitué, on trouve R_2 .

Le degré de substitution sera calculé de la façon suivante :

$$\text{d.d.s.} = \frac{R_2}{R_1} \times 100.$$

3. Obtention des fibres :

La solution à 1% de dérivé du chitosan, qui résulte du milieu réactionnel précédent, est diluée au 1/7^e puis dispersée dans une solution méthanolique de diéthylamine 2N. La solution alcaline utilisée permet de déprotoner les groupements amines non substitués et protonés sous l'effet de la dissolution du chitosan dans l'acide acétique. Ceci permet de précipiter les fibres. Les fibres microscopiques obtenues sont récupérées par filtration sous vide, lavées et déshydratées à l'aide de l'alcool isopropylique.

Les fibres humectées contenant une quantité résiduelle d'alcool isopropylique, sont conservées dans un flacon fermé à l'abri de l'air et de la lumière (Figure 8).

Une autre approche de formation des fibres consiste à effectuer un dernier lavage des fibres à l'aide de l'éther éthylique, un autre agent déshydratant.

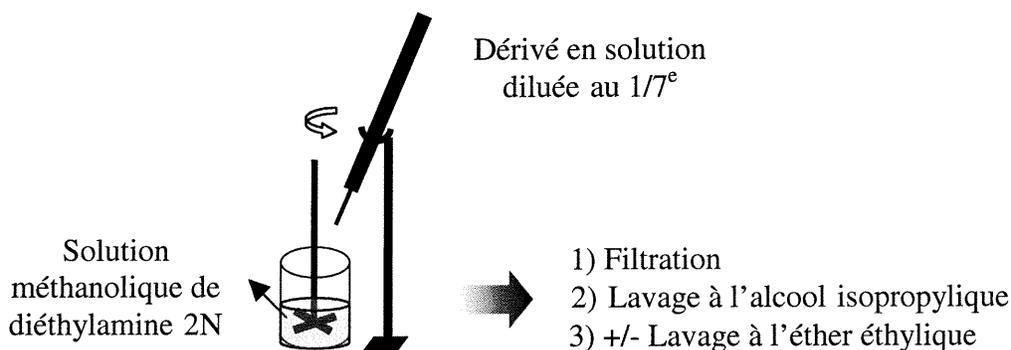


Figure 8 : Obtention des fibres.

3.1 Evaluation des fibres :

L'aspect des fibres du dérivés butyrique du chitosan à 20% de substitution a été évalué à l'aide d'un microscope optique à fluorescence type Zeiss. Des photos digitales des fibres observées à la lumière blanche au grossissement 60 ont été captées à l'aide d'une caméra couleur.

Les échantillons de fibres ont été placés entre lame et lamelle. Ils ont été observés à l'état mouillé à l'aide du solvant de lavage et à l'état sec.

4. Formation des pellicules :

4.1 Détermination de la quantité de fibres à utiliser :

Les pellicules ont été préparées à partir des fibres mouillées résultant du lavage à l'aide de l'alcool isopropylique ou de l'éther éthylique, et de la filtration.

Afin de pouvoir reproduire la quantité de fibres nécessaire pour préparer une pellicule, il est indispensable de déterminer le poids de fibres mouillées correspondant au poids de fibres sèches nécessaires à la préparation d'une pellicule. Pour cela, un échantillon de fibres mouillées est séché afin de déterminer le poids sec correspondant. Le poids de fibres à prélever pour la formation des pellicules sera déduit de la formule suivante :

$$M_{H,1} \times M_{S,2} = M_{H,2} \times M_{S,1} ,$$

où, $M_{H,1}$: Poids de l'échantillon de fibres mouillées prélevé.

$M_{S,2}$: Poids de fibres sèches recommandé pour préparer une pellicule.

$M_{H,2}$: Poids de fibres mouillées correspondant au poids de fibres sèches nécessaires à la préparation d'une pellicule.

$M_{S,1}$: Poids sec correspondant à l'échantillon prélevé.

4.2 Préparation proprement dite de la pellicule :

La quantité de fibres mouillées correspondant à 0.15 g, nécessaire pour préparer une pellicule de 5 cm de longueur et de 4 cm de largeur, est dispersée dans l'alcool isopropylique sous agitation continue. Une fois homogénéisé, le mélange est versé sur un tamis de 200 « mesh ». Ainsi, une majeure partie de l'alcool isopropylique est éliminée et les fibres du chitosan substitué sédimentent au fond du tamis.

Le tamis est ensuite égoutté, et le gâteau de fibres est transféré dans un tissu en polyester et essoré par compression entre deux plaques métalliques lisses d'une presse hydraulique du type Carver, à la pression de 2.3 tonnes métriques.

La pellicule obtenue est détachée du tissu en polyester et comprimée une deuxième fois de la même façon, puis séchée à l'air libre (Figure 9).

Lorsque le dernier lavage s'effectue à l'aide de l'éther éthylique, toutes les étapes précitées doivent être effectuées le plus rapidement possible afin d'éviter le dessèchement des fibres.

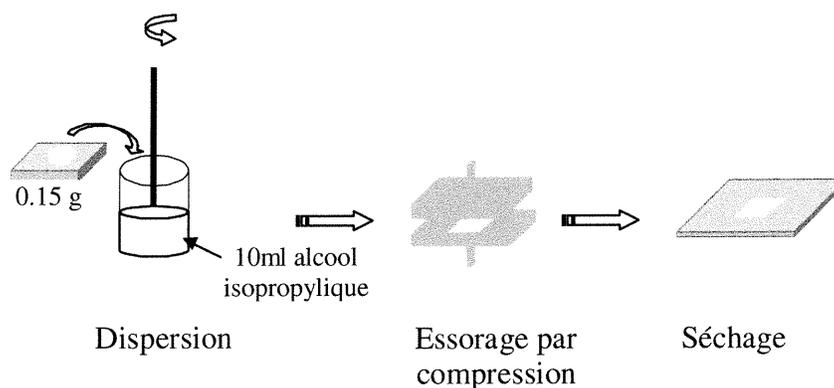


Figure 9 : Formation des pellicules.

4.3 Effet de la nature du dérivé de chitosan et du degré de substitution sur la densité des pellicules :

L'effet de la nature du dérivé employé et du degré de substitution sur la masse utilisée, a été étudié. La méthode consiste à préparer des pellicules de chacun des dérivés à 20% et à 80% de d.d.s., de 20 cm² de surface et de 200 μm d'épaisseur ($v= 400 \text{ mm}^3$). La masse est expérimentalement déterminée en pesant les pellicules à l'aide d'une balance électronique ($E=0.1 \text{ mg}$). La déduction de la densité de chacune des pellicules est alors possible en divisant la masse exprimée en grammes par le volume exprimé en cm³.

4.4 Evaluation des pellicules :

Les pellicules ont été évaluées à l'aide de la microscopie optique et de la microscopie à force atomique (AFM).

4.4.1 La microscopie optique :

Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope optique type Leica. Ils ont été fixés sur une lame en verre et observés au grossissement 5 puis 20, en utilisant la lumière blanche. Un système d'imagerie digitale relié au microscope a pour but de capter des photos digitales à l'aide d'une caméra couleur, de les analyser et de visualiser la microstructure des pellicules.

4.4.2 La microscopie à force atomique :

La microscopie à force atomique (AFM) est une forme de la microscopie à balayage de sonde (Scanner Prob Microscopy, SPM). Elle fait partie de la famille des microscopes où une sonde balaie la surface du matériel à explorer, permettant la détection des interactions intermoléculaires au sein de l'échantillon à évaluer. Il existe trois modes de détection de ces interactions : le mode par contact (contact mode), par absence de contact (non-contact mode) et le mode par tapotement (tapping mode).

Le mode par tapotement est le mode AFM employé dans l'évaluation des pellicules. Une aiguille ou « pointe » se déplace à la surface de l'échantillon à analyser en effectuant des oscillations. Elle touche légèrement la surface de l'échantillon tout en exerçant une faible force de chargement. La déflexion de la pointe fait état des forces d'interaction établies entre les atomes de la pointe et ceux de l'échantillon.. Un faisceau de laser se réfléchit sur la matrice portant la pointe selon une direction angulaire qui change lorsque la pointe subit la déflexion. Le faisceau réfléchi est capté et converti en signaux électriques à l'aide de photo-détecteurs sensibles aux positions de la pointe. Cette conversion sert dans certains cas à produire des images moléculaires. Un levier optique amplifie le signal de déflexion jusqu'à 1000 fois afin de pouvoir détecter des déflexions inférieures à 1nm^2 .

L'amplitude et la fréquence des oscillations de la pointe doivent être maintenues constantes tout au long du processus de prise d'images.

Les échantillons analysés par microscopie à force atomique ont été fixés sur une lame en verre. Des images topographiques et de phases ont été observées : les images topographiques permettent d'analyser l'état de surface de l'échantillon examiné tandis que les images de phase sont des représentations physiques des différences de consistance et de composition chimique au sein de la même pellicule.

5. Étude in vitro de l'activité microbiologique-Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :

L'étude in vitro de l'activité microbiologique vise à prédire l'effet inhibiteur de chacun des dérivés acétique, butyrique et caproïque à 20% et à 80% de d.d.s., vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*.

Cet effet inhibiteur aurait un rôle *in vivo* dans la prévention de l'infection des plaies. Il est déterminé à l'aide de la CMI définie comme étant la plus petite concentration du produit capable de suspendre toute croissance de germe⁹³.

5.1 Le milieu de culture :

Le milieu de culture recommandé par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) pour les bactéries aérobies est le milieu Müeller-Hinton (MH) liquide à base d'hydrolysate acide de caséine (17.5 g/l), d'extrait de bœuf (3 g/l) et d'amidon (1.5 g/l). Le milieu de culture MH liquide est tamponné. A 25°C, son pH est situé entre 7.2 et 7.4⁹⁴.

5.2 L'inoculum :

L'inoculum provient des souches de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Ces deux espèces bactériennes sont impliquées dans l'infection des plaies^{18, 29}, complication redoutable des plaies en cours de cicatrisation.

La charge bactérienne de départ fut standardisée à $2 \cdot 10^5$ bactéries/ml, située dans l'intervalle 10^5 - 10^6 bactéries/ml de détermination de la CMI.

5.3 Les échantillons :

La détermination de l'effet anti-bactérien des dérivés acétique, butyrique et caproïque, à 20% et à 80% de d.d.s., se fait à l'aide d'une solution de chacun des dérivés dans l'acide acétique stérile à 0.03125% dont le pH est 3.54. La concentration de chacun des dérivés réduits en fibres dans la solution acétique est de 3.2 mg/ml. Cette concentration massique correspond à différentes

concentrations molaires qui dépendent de la nature des dérivés et du degré de substitution.

La solution d'acide acétique utilisée doit dissoudre les différents dérivés à étudier, sans interférer avec les résultats de l'étude de la CMI. C'est la raison pour laquelle, il a été nécessaire de déterminer la CMI de l'acide acétique.

5.4 Détermination proprement dite de la CMI :

En se basant sur l'action immobilisatrice cellulaire du chitosan, on peut considérer que le chitosan et ses dérivés sont capables d'immobiliser les cellules microbiennes et d'inhiber leur prolifération^{66, 67, 68}. Il s'agit dans notre cas de déterminer le pouvoir bactériostatique des différents dérivés à 20% et à 80% de d.d.s., en déterminant leur CMI vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.4.1 Détermination de la charge bactérienne de départ par comptage des unités formant des colonies (figure 10) :

Une des techniques permettant de déterminer le nombre de micro-organismes vivants dans une suspension consiste à faire des dilutions décimales d'un volume connu d'une suspension bactérienne, de façon à ce qu'un volume connu d'une des dilutions, inoculé sur un milieu solide, donne des colonies suffisamment isolées pour qu'on puisse les compter et déduire ainsi la concentration bactérienne de la suspension initiale.

Le nombre d'unités formant des colonies par ml ou CFU/ml, est égal au nombre de colonies apparues sur la boîte de Pétri divisé par le produit du volume et de la dilution inoculés.

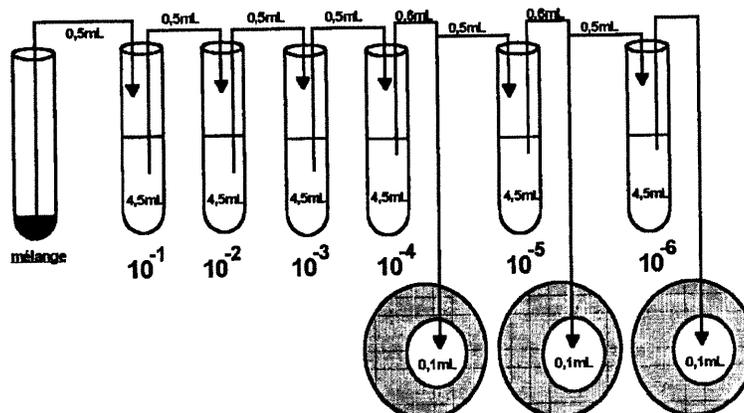


Figure 10 : Comptage des unités formant des colonies.

$$\text{Nombre de CFU/ml} = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Dilution inoculée} \times \text{Volume inoculé}}$$

5.4.2 Relation entre la charge bactérienne et l'absorbance de la suspension :

La turbidité d'une suspension de particules diluée est proportionnelle à sa concentration. Elle peut être déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre dans le visible dont le rôle est de comparer la quantité de lumière qui traverse la suspension trouble à la quantité de lumière qui traverse la suspension contrôle limpide. Un photomètre convertit la lumière détectée et la transforme en impulsions électriques qui peuvent être quantifiées⁹⁵.

Dans cette étude, la suspension correspond au milieu de culture MH liquide où les bactéries ont poussé et la suspension standard correspond au milieu de culture MH stérile.

Un problème relié à l'utilisation du spectrophotomètre est sa capacité de mesurer uniquement le faisceau lumineux primaire qui passe à travers un échantillon et qui atteint la cellule photonique sans subir de déviation. Un autre problème d'utilisation du spectrophotomètre est la variation de l'absorbance en fonction de la taille et de la forme des cellules microbiennes, ceci pour un âge donné de la culture.

Une courbe de calibration reliant l'absorbance à la charge bactérienne est capable de résoudre ces deux problèmes. Pour cela, une série de dilutions est faite à partir d'une suspension préalablement agitée de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* respectivement.

La lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre dans le visible (650 nm) et le plus rapidement possible tout en plaçant la suspension concentrée alternativement dans un bain de glace afin que la croissance bactérienne n'affecte pas les mesures nécessaires⁹⁶.

La figure 11 montre un exemple de calibration reliant la concentration microbienne en µg/ml, déterminée relativement au poids sec des bactéries, à l'absorbance mesurée par spectrophotométrie.

Théoriquement, cette relation se traduit par l'équation d'une droite qui passe par l'origine :

$$A = K \times C,$$

où, A : Absorbance lue au spectrophotomètre ;

K : Pente de la droite théorique ;

C : Concentration bactérienne exprimée en µg/ml.

La figure 11 montre que la courbe expérimentale dévie légèrement de la linéarité⁹⁶.

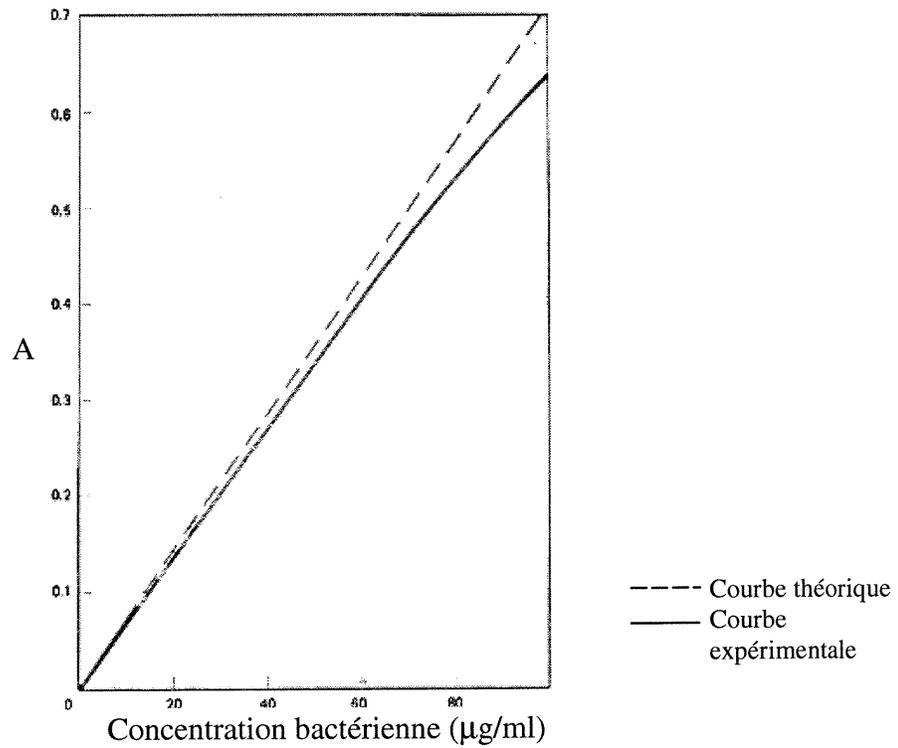


Figure 11 : Courbes théorique et expérimentale de l'absorbance (à 420 nm) en fonction de la concentration bactérienne⁹⁶.

Dans la présente étude, la détermination de la charge bactérienne du départ est effectuée par analogie à la méthode mentionnée ci-dessus ; il s'agit de trouver une relation entre l'absorbance et la charge bactérienne de départ.

5.4.3 Mode opératoire :

La détermination de la CMI a été effectuée selon les normes fixées par le NCCLS. Les microorganismes sont inoculés dans une série de tubes contenant une gamme de concentration de chitosan qui décroît selon une fonction logarithmique à base 2 jusqu'à la plus faible concentration à tester. La plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible de microorganismes correspond à la CMI⁹⁷.

Pratiquement, 1 ml de la suspension bactérienne obtenue après 24 heures d'incubation, dont la charge est ajustée à 4.10^5 CFU/ml, estensemencé dans 1 ml du milieu de solution acétique à 0.03125% de chacun des dérivés à 3.2 mg/ml, dont la concentration décroît selon un logarithme à base 2 par dilution à l'aide du milieu de culture MH liquide. Les tubes sont laissés en incubation durant 16-18 heures à 35°C puis retirés de l'étuve. La lecture se fait à l'œil nu : la CMI correspond à la plus faible concentration en soluté qui empêche l'apparition de la turbidité.

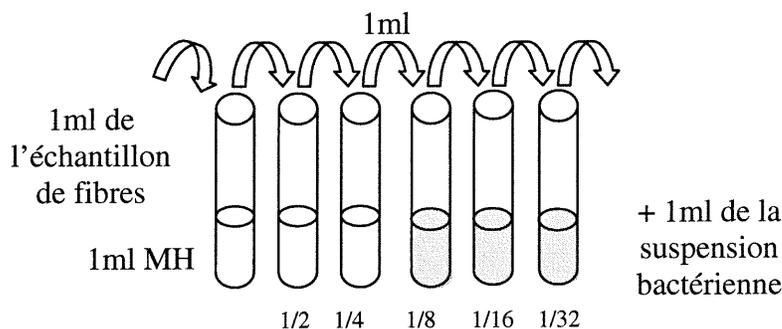


Figure 12 : Exemple de détermination de la CMI.

Dans l'exemple de la figure 12,

$CMI = 1/4 \times C_0$, où C_0 : Concentration initiale de l'échantillon étudié.

Facteurs qui affectent les résultats de l'activité anti-microbienne :

- Facteurs liés au solvant :

L'utilisation d'un solvant différent de l'eau pourrait influencer l'activité anti-microbienne, soit par une toxicité inhérente au solvant, soit par son effet sur l'activité thermodynamique de l'agent anti-microbien⁹⁸.

En effet, l'acide acétique glacial est un agent bactéricide qui entraîne une baisse du pH du milieu jusqu'à une valeur critique qui empêche la survie des micro-organismes. Le pH du milieu affecte la dissociation des groupements fonctionnels au niveau des molécules protéiques et l'activité enzymatique est optimale au pH correspondant à un degré de dissociation particulier⁹⁹.

L'intérêt réside donc dans la détermination de la CMI de l'acide acétique afin de dissoudre les dérivés du chitosan dans une solution aqueuse d'acide acétique à une concentration inférieure à la CMI. Ce fait évite l'interférence de l'acide acétique avec les résultats.

La détermination de la CMI de l'acide acétique a été faite selon le même protocole de détermination de la CMI des dérivés du chitosan. A partir d'une solution d'acide acétique à 1%, on a effectué une série de dilutions géométriques. La CMI correspond à la plus faible concentration en acide acétique qui empêche l'apparition de la turbidité.

- Facteurs liés aux dérivés :

Les dérivés acétique, butyrique et caproïque en solution acétique pourraient précipiter. Ceci dépendrait de leur solubilité dans l'acide acétique à 0,03125% (pH3.54), de leur concentration dans cette solution et de l'incubation de ces solutions dans le milieu de culture MH liquide. L'effet des facteurs liés au solvant a été étudié en préparant pour chacun des dérivés, une gamme de tubes blancs où le dérivé en question est incubé à 35°C pendant 18 heures, en présence d'un volume égal du milieu de culture MH liquide.

- Stérilisation des solutions :

La préparation des fibres de chacun des dérivés acétique, butyrique et caproïque se fait dans des conditions ordinaires sans atmosphère de travail stérile. Il faut donc penser à stériliser les produits dont on veut tester l'activité microbiologique, afin de ne pas voir émerger des bactéries indésirables qui pourraient biaiser les résultats de l'étude.

La stérilisation des solutions acétiques de chacun des dérivés a été faite par filtration stérilisante. Selon le USP XXII, la filtration dans des buts de stérilisation se fait à travers des membranes de porosité inférieure ou égale à 0.22 μm . L'utilisation d'un tel filtre dans la présente étude est impossible à cause de la viscosité élevée, qui empêche le passage des échantillons à travers des pores de 0.22 μm de diamètre.

La filtration a été réalisée à l'aide d'un filtre de porosité égale à 0.45 μm à cause de la viscosité des solutions dont on veut déterminer l'effet antimicrobien.

Le procédé de synthèse des différents dérivés, une incubation de 100 mg d'échantillons de fibres dans le milieu de culture MH liquide à 35°C pendant 24 heures, le mode de préparation des échantillons ayant servi à l'étude microbiologique et la préparation d'une gamme de tubes blancs correspondant aux différentes concentrations des dérivés dans la solution acétique sont analysés. Cette analyse a pour but de voir si l'utilisation des filtres de 45 μm de porosité permet de contourner le problème primordial de la viscosité tout en satisfaisant aux besoins de l'étude.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Exemple de validation du degré de substitution :

La validation du degré de substitution par spectroscopie RMN (^1H) a été développée dans d'autres études effectuées au sein de nos laboratoires. Notre travail sert à confirmer la validité de cette méthode à l'aide de l'exemple du dérivé N-butyryl chitosan à 50% de substitution (annexe).

$$R_1 (\text{à } 100\% \text{ de substitution}) = 2.35/1 \Rightarrow R_1 = 2.35 ;$$

$$R_2 (\text{à } 50\% \text{ de substitution}) = 0.1/0.08 \Rightarrow R_2 = 1.25;$$

$$\text{d.d.s.} = (1.25/2.35) \times 100$$

$$\Rightarrow \text{d.d.s.} = 53.19\% .$$

2. Obtention de fibres :

La visualisation de la structure fibreuse est rendue possible grâce au microscope optique au grossissement 60. Les figures 13, 14, 15 et 16 représentent les différents aspects des fibres de N-butyryl chitosan à 20% de degré de substitution. Ces fibres sont préparées conformément aux deux procédés de lavage. Les échantillons sont placés entre lame et lamelle et les photos sont prises à l'état humide et à l'état sec.

La comparaison des figures 13 et 14 permet de constater que le lavage des fibres à l'alcool isopropylique (Fibres A) provoque une perte de l'aspect fibreux obtenu lors de la préparation des fibres et donne lieu à un gel. Cette structure est totalement différente de celle observée après séchage, où le gel collé à la surface de la lame et de la lamelle se rétracte après évaporation de l'alcool isopropylique. Une telle situation pourrait être expliquée par la solvataion des molécules de N-butyryl chitosan provoquée par l'alcool isopropylique.

La solvataion provoque une rupture du réseau cristallin du polymère. Des liaisons du type van der Waals, ponts hydrogène ou encore un transfert de charges s'établissent par la suite entre les molécules du solvant et celles du soluté¹⁰⁰.

Les figures 15 et 16 correspondant aux fibres de N-butyryl chitosan à 20% de substitution lavés à l'éther éthylique (Fibres B) sont identiques. Dans ce cas, l'éther éthylique s'avère être un vrai déshydratant des fibres. Il permet de conserver la structure fibreuse depuis la dispersion jusqu'au séchage.

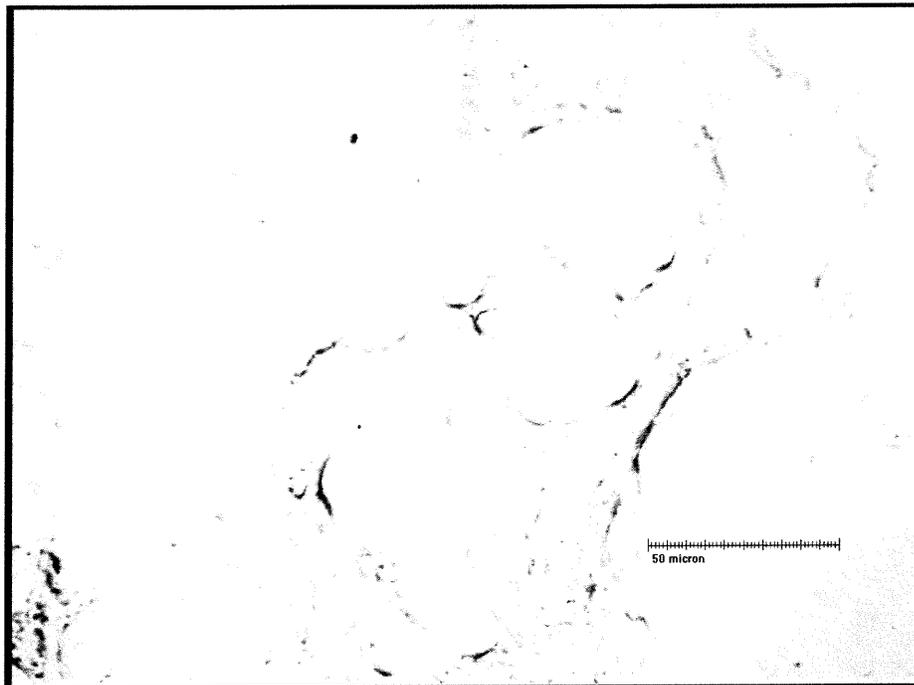


Figure 13: Fibres A mouillées.

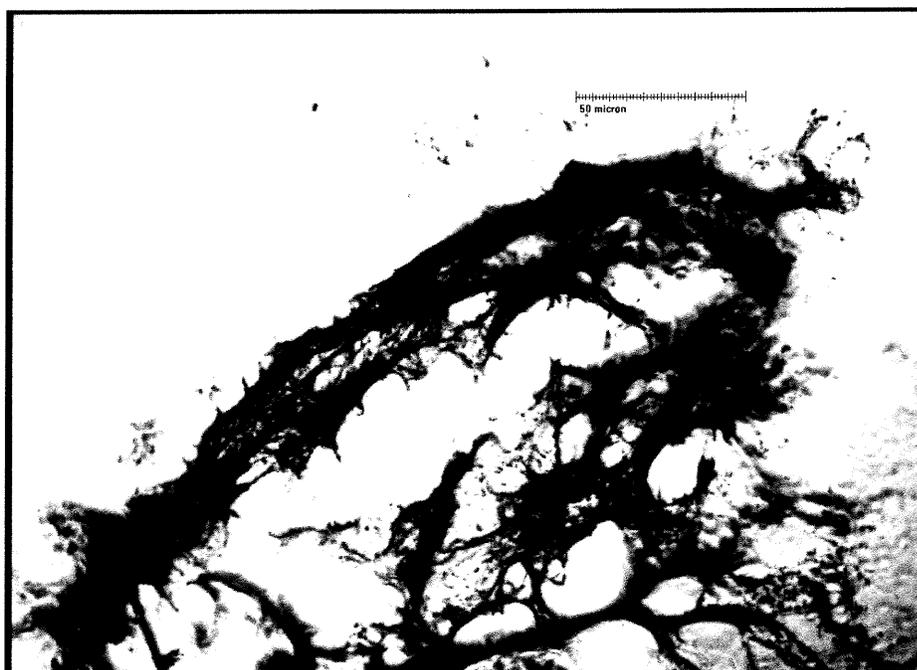


Figure 14: Fibres A sèches.



Figure 15: Fibres B mouillées.



Figure 16: Fibres B sèches.

Dans le but de coaguler les dérivés du chitosan en suspension sous l'effet du flux laminaire induit par agitation, l'utilisation de la solution méthanolique de diéthylamine 2N repose sur les faits suivants :

- La solution méthanolique de diéthylamine 2N est utilisée durant le processus de purification du chitosan en tant que milieu faiblement alcalin capable de coaguler le chitosan par déprotonation des groupements amines libres⁹⁰.
- La coagulation du chitosan effectuée en milieu fortement alcalin d'hydroxyde de sodium à 50% p/p ne permet pas d'obtenir des fibres prêtes à former des pellicules, mais conduit à la formation de fibres macroscopiques ou « fibrilles » qui doivent être broyées afin de servir à la préparation des pellicules⁸⁹. La coagulation du chitosan à l'aide de la solution méthanolique 2N permet d'éviter le broyage avant la compression parce qu'elle est capable de donner des fibres de petites tailles prêtes à la compression.

3. Formation des pellicules :

3.1 Effet de la nature du dérivé de chitosan et du degré de substitution sur la densité des pellicules :

La quantité nécessaire pour préparer une pellicule à base d'un dérivé du chitosan dépend, pour un volume donné de la pellicule, de la nature du dérivé utilisé et de son degré de substitution. Le tableau III montre la masse (M) et la densité (d) correspondant à chacune des pellicules de dérivés acétiques, butyriques et caproïques à 20% et à 80% de d.d.s.. Un exemple du N-butyryl chitosan à 50 % de degré de substitution a été aussi étudié. Le volume de ces pellicules est de 400 mm³.

Degré de substitution	20%		50%		80%	
	M (mg)	d	M (mg)	d	M (mg)	d
N-acétyl chitosan	397	0.99	-	-	281	0.71
N-butyryl chitosan	369	0.92	304	0.76	269	0.67
N-caproyl chitosan	424	1.06	-	-	300	0.75

Tableau III : Effet du degré de substitution sur la densité des pellicules.

Le tableau III permet de conclure que la densité diminue lorsque le degré de substitution augmente, et la masse nécessaire pour préparer des pellicules d'épaisseur identique devrait par conséquent diminuer.

3.2 Evaluation des pellicules :

Les photos des pellicules agrandies cinq fois de N-butyryl chitosan à 20% de substitution ont été observées à l'aide du microscope optique type Leica. Les figures 18 et 19 correspondant aux pellicules obtenues après dispersion des fibres dans l'alcool isopropylique (Pellicule A) et dans l'éther éthylique (Pellicule B) respectivement permettent de constater que l'arrangement des fibres dans le cas des pellicules A et B se fait selon des directions prédéterminées par les fils du tissu en polyester employé lors de l'essorage par compression (Figure 17). Cet arrangement est dû à la pression qui oblige les fibres à subir l'empreinte du tissu. En comparant la figure 17 aux figures 18 et 19, on constate que l'impact de cette pression sur la microstructure de la pellicule A est supérieur à son impact sur la pellicule B.

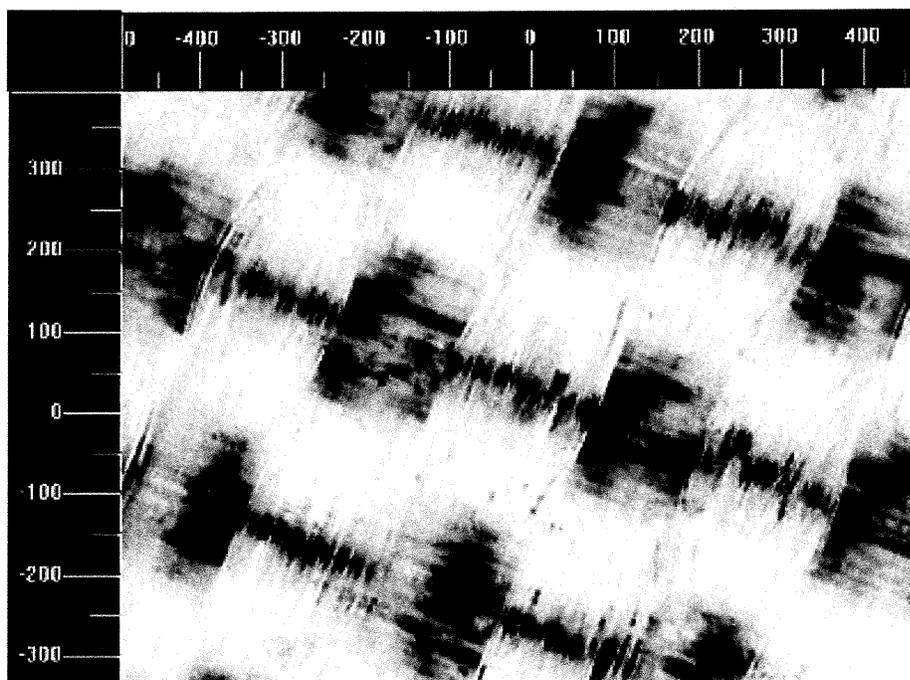


Figure 17: Tissu en polyester

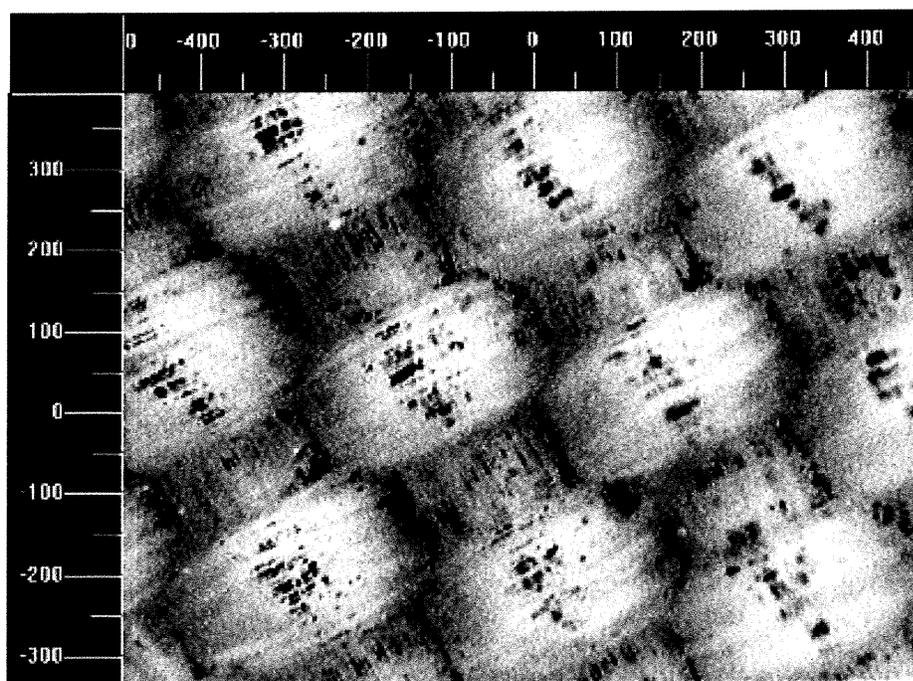


Figure 18: Pellicule A

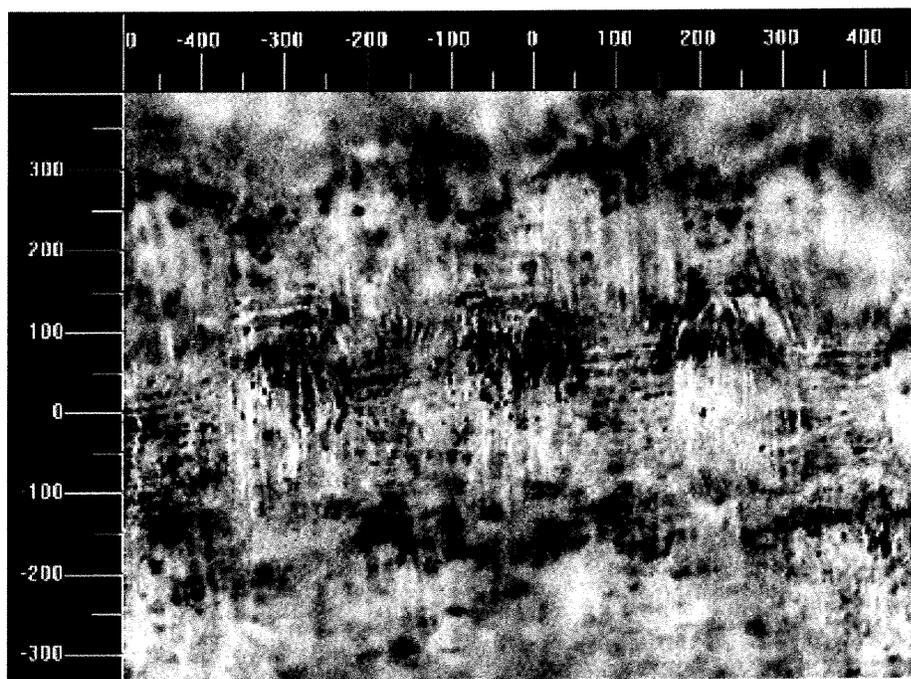


Figure 19: Pellicule B

L'observation des photos agrandies vingt fois du tissu (Figure 20) et des échantillons de fibres A (Figure 21) et de fibres B (Figure 22), montrent que les fibres A sont quasi-parfaitement alignées, rappelant la microstructure filamenteuse du tissu employé lors de la compression (Figure 20). La reproduction de la surface du tissu est d'une part due à la solvation qui renforce l'adhésion entre les molécules par établissement de liaisons de faible énergie, et d'autre part à la fusion des fibres provoquée par la compression lors de l'essorage. Les fibres B (Figure 22) montrent une microstructure différente qui garde difficilement l'empreinte du tissu. Ceci prouve que les fibres n'ont pas été solvatées et qu'elles ont conservé leur structure fibreuse individuelle.

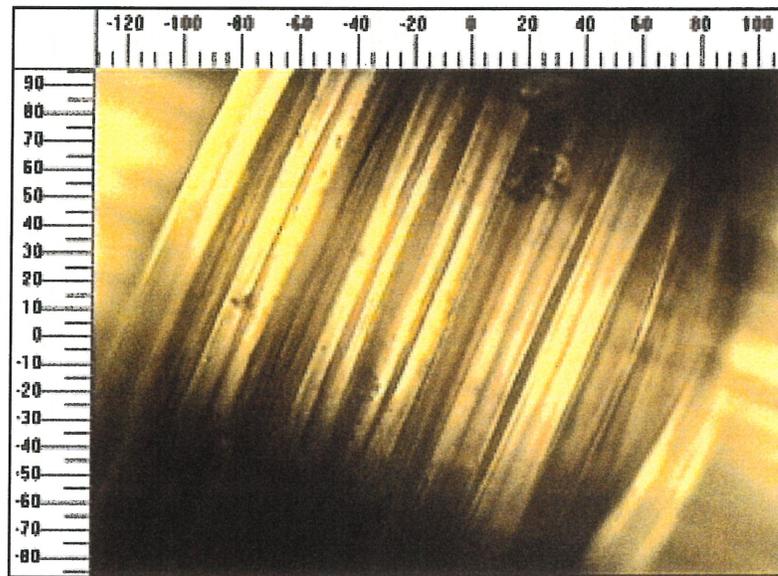


Figure 20: Photo agrandie du tissu en polyester.

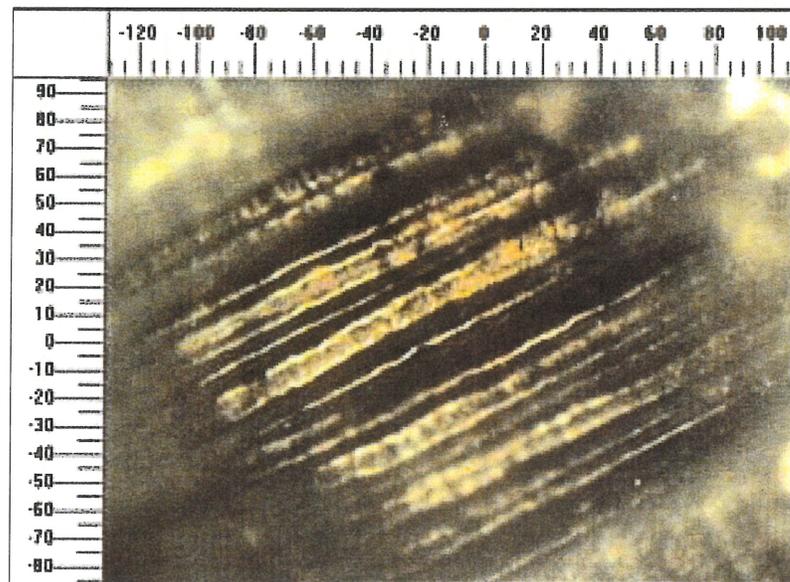


Figure 21: Photo agrandie de la pellicule A.

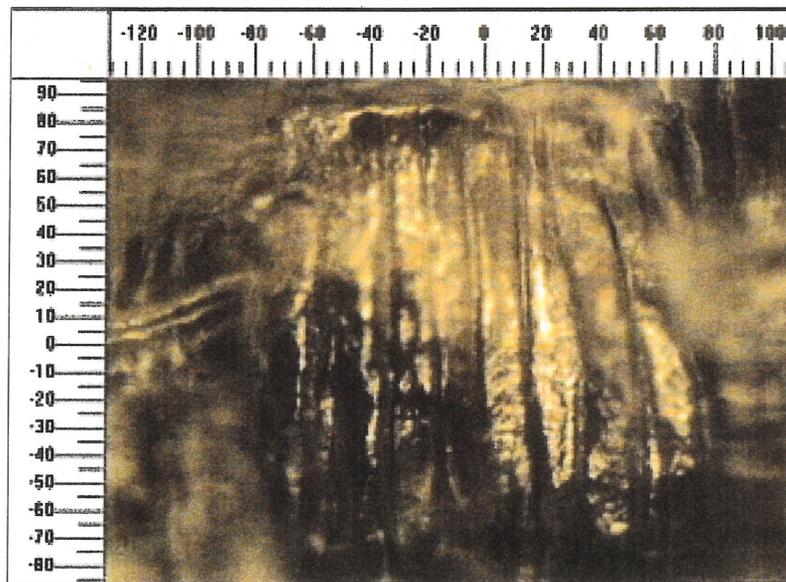


Figure 22: Photo agrandie de la pellicule B.

Des photos (Figures 25, 26, 27 et 28) de microscopie à force atomique (AFM) prises à l'aide d'un nanoscope à image tridimensionnelle 3100 reflètent l'aspect topographique et l'état de phase d'une petite superficie ($100 \mu\text{m}^2$) de pellicule de N-butyryl chitosan à 20% de substitution.

La performance de l'AFM favorise une détection très sensible des forces moléculaires telles que les liaisons hydrogène, les forces du type van der Waals et les forces électrostatiques⁹².

La topographie de surface du tissu en polyester (Figure 23) montre une surface parfaitement lisse qui explique en partie celle de la pellicule A (Figure 25). La topographie de surface de la pellicule A indique une ultrastructure faiblement rugueuse et presque lisse, parcourue par des bandes claires et alignées. Ceci est dû à la perte de la structure fibreuse, provoquée d'une part par la solvataion des fibres qui

conduit à la formation d'un gel, et d'autre part par la fusion des fibres produite lors de l'essorage par compression.

Contrairement à ce qui précède, la topographie de surface de la pellicule B (Figure 27) représente une ultrastructure nettement rugueuse qui correspond à l'enchevêtrement des fibres ; comportement normal des fibres essorées par compression.

Les photos de phase du tissu en polyester (Figure 24) et des deux pellicules (Figures 26 et 28) traduisent des différences de consistance et de composition chimique au sein de la même pellicule. Elles montrent des zones claires traduisant une structure chimique différente de celle des zones sombres.

Dans le cas du tissu en polyester (Figure 24), la photo de phase est uniforme; un fait qui s'explique par la nature homogène du matériel utilisé dans sa fabrication.

La photo de phase de la pellicule A (Figure 26) montre des régions sombres et d'autres claires nettement distinctes. Ce phénomène pourrait être dû à la gélification des fibres sous l'effet de l'alcool isopropylique. La gélification permet un réarrangement moléculaire adéquat des dérivés et produit une différence de consistance au sein de la même pellicule. La compression permet une séparation nette entre les différentes structures moléculaires produites.

Les différences de phase observées dans la pellicule B sont moindres (Figure 28), ce qui traduit l'absence de réarrangement moléculaire et de séparation entre les différentes structures. La structure de cette pellicule est par la suite plus homogène.

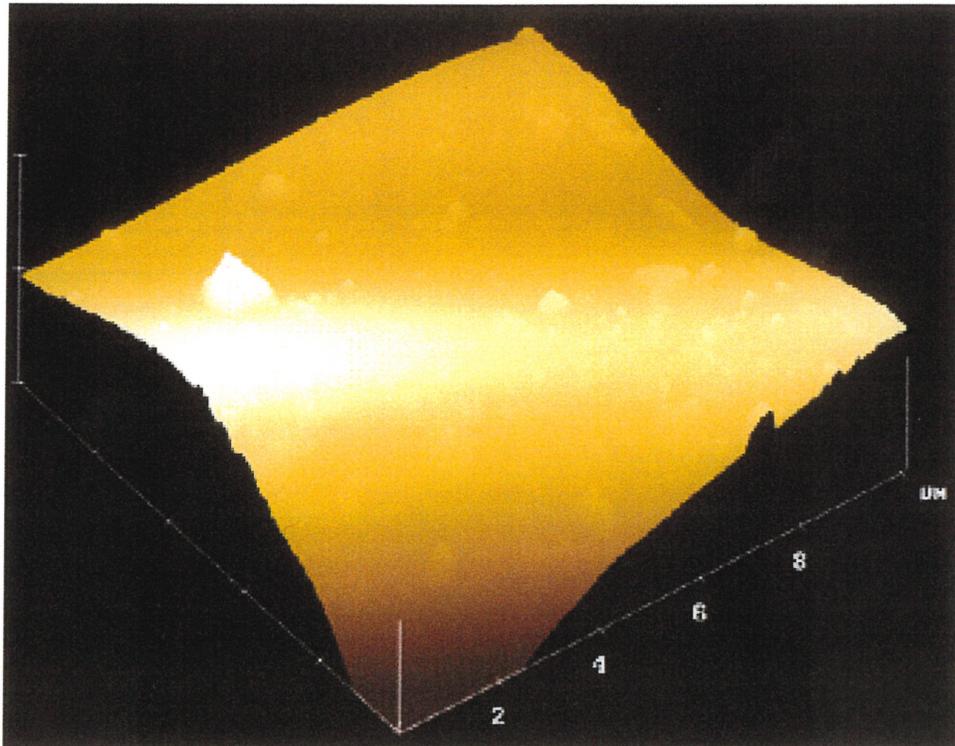


Figure 23: Topographie AFM du tissu en polyester

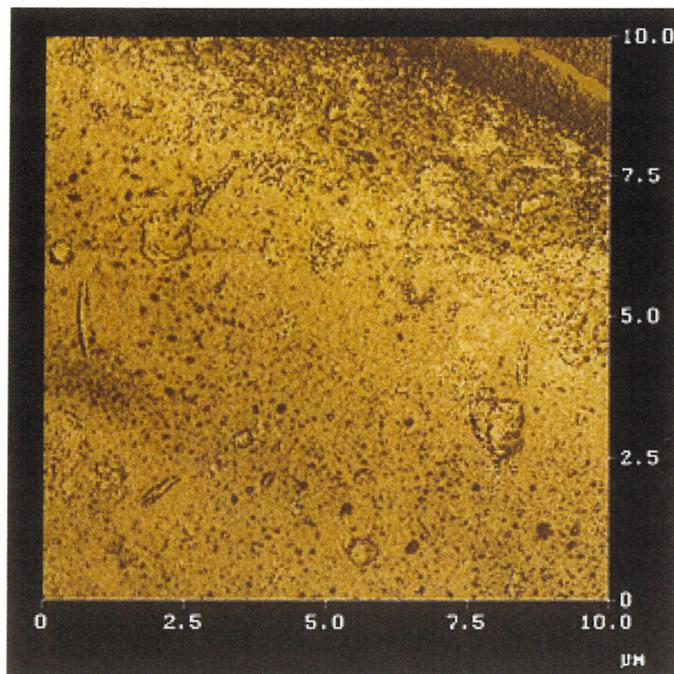


Figure 24: Phase AFM du tissu en polyester

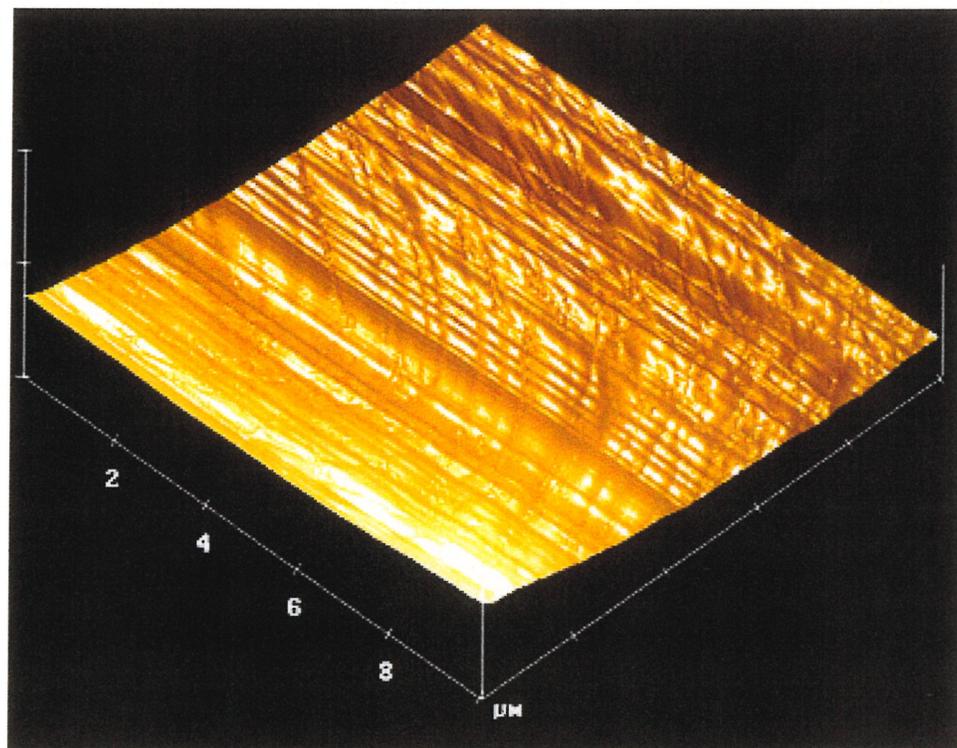


Figure 25: Topographie AFM de la pellicule A.

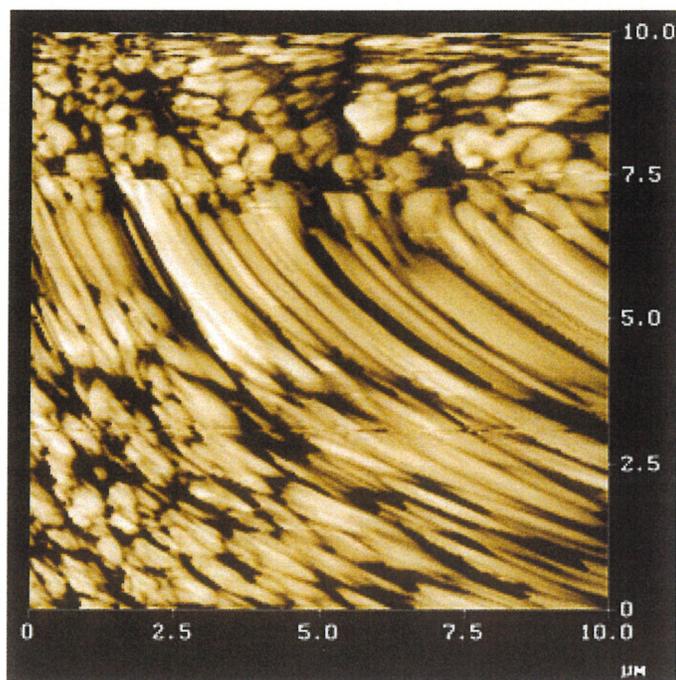


Figure 26: Phase AFM de la pellicule A.

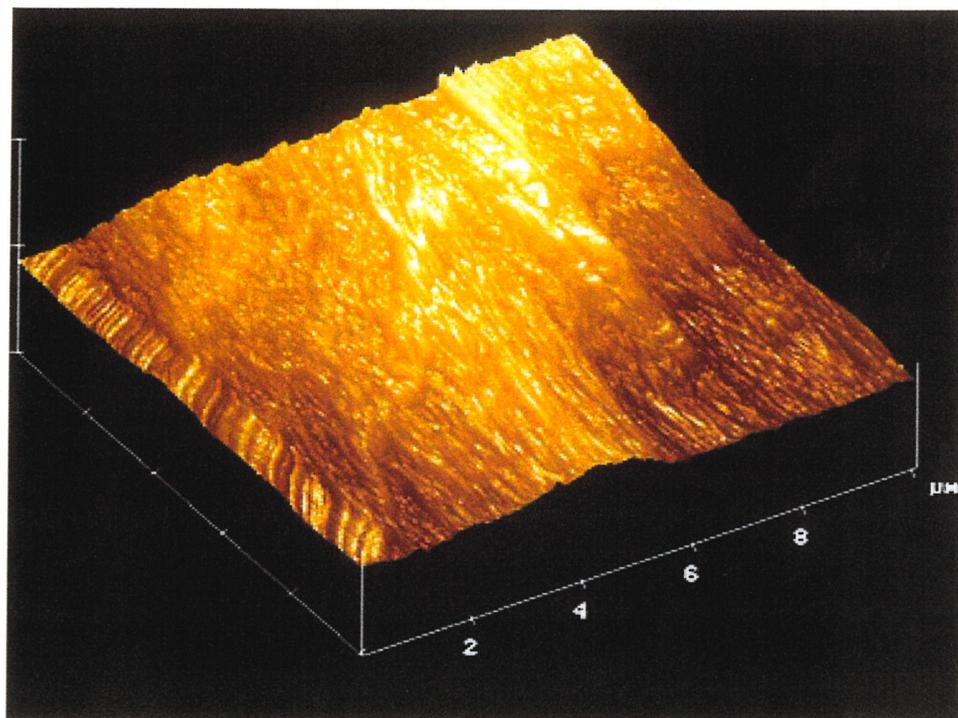


Figure 27: Topographie AFM de la pellicule B.

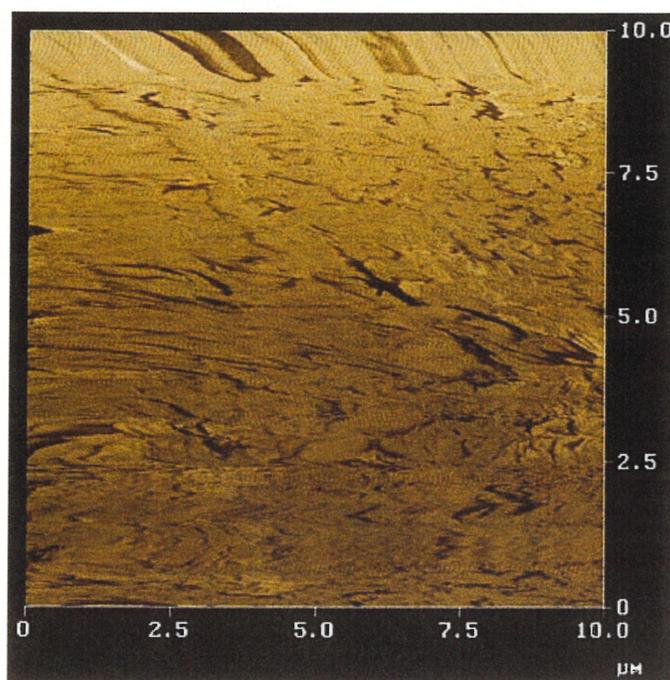


Figure 28: Phase AFM de la pellicule B.

La fusion des fibres explique pourquoi les pellicules des dérivés acétique, butyrique et caproïque obtenues à partir des fibres lavées et dispersées dans l'alcool isopropylique adhèrent au tissu en polyester lors de l'essorage par compression. Cette adhésion peut-être évitée en mouillant le tissu par l'alcool isopropylique tout le long du processus de détachement de la pellicule.

La friabilité de ces pellicules pourrait constituer un obstacle à leur utilisation en tant que pansements des plaies vu qu'elles seraient incapables de se maintenir en place et d'épouser la surface cutanée. Cependant, elles pourraient servir de pansements des plaies après trempage dans une solution saline.

En se basant sur les données de la littérature¹⁰¹, et dans le but d'améliorer ces propriétés, un essai a eu lieu à l'aide du glycérol. Cet essai consiste à ajouter le glycérol au milieu dispersant d'alcool isopropylique dans une proportion de 2:1, et de faire couler le tout sur le tamis. L'échec de la compression de ce mélange pourrait être justifié par une forte solvation des dérivés du chitosan, provoquée par le glycérol.

La déshydratation des fibres à l'aide de l'éther éthylique permet l'obtention de propriétés mécaniques supérieures à celles obtenues par dispersion dans l'alcool isopropylique. Les pellicules des dérivés acétique, butyrique et caproïque ainsi préparées sont dotées d'une meilleure flexibilité et d'une plus grande résistance à la déchirure. En plus, elles n'adhèrent pas au tissu en polyester lors de l'essorage.

4. Étude in vitro de l'activité microbiologique-Détermination de la CMI :

4.1 Relation entre la charge bactérienne et l'absorbance :

On a constaté que la courbe expérimentale de l'absorbance en fonction de la charge bactérienne de chacun de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* se rapproche d'une droite qui passe par l'origine. Cette courbe a été réalisée à partir d'un inoculum mis en incubation durant 16 à 18 heures à la température de 35°C. Le nombre de CFU/ml a été déduit selon des dilutions effectuées sur cette suspension.

➤ Pour *Staphylococcus aureus* :

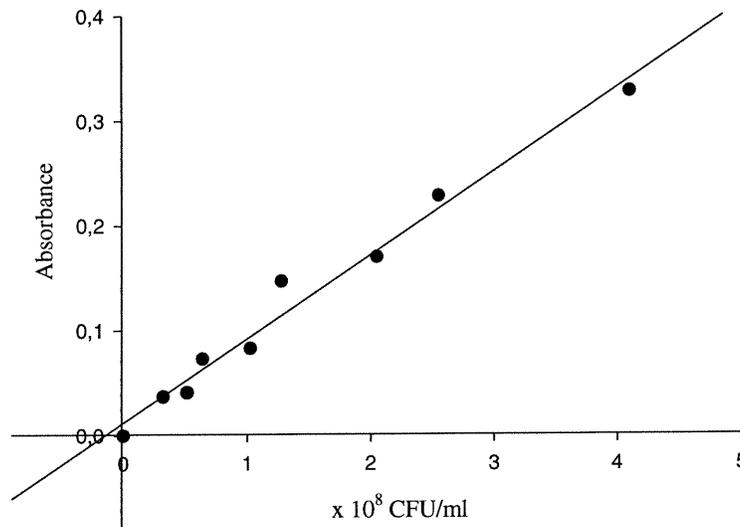


Figure 29 : Courbe de calibration de l'absorbance en fonction de la charge bactérienne en *Staphylococcus aureus*.

- Equation de la droite dans le cas de *Staphylococcus aureus* :

$$A = (799 \times \text{CFU/ml} \times 10^{-8} + 124) \times 10^{-4},$$

$$\text{avec } R^2 = 0.978$$

➤ Pour *Pseudomonas aeruginosa* :

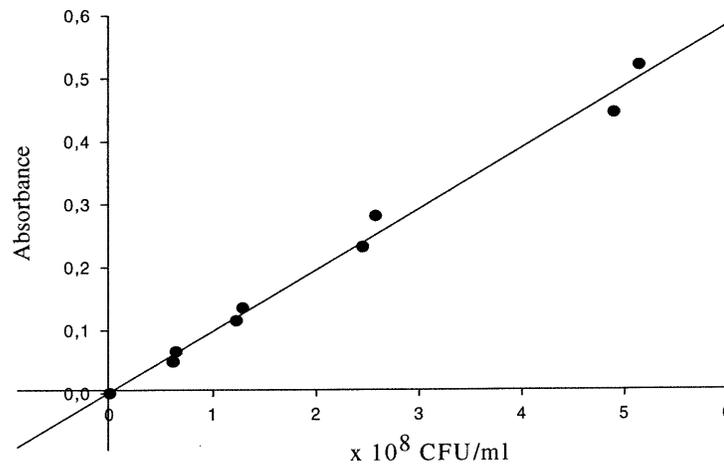


Figure 30 : Courbe de calibration de l'absorbance en fonction de la charge bactérienne en *Pseudomonas aeruginosa*.

- Equation de la droite dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* :

$$A = (968 \times \text{CFU/ml} \times 10^{-8} + 22) \times 10^{-4},$$

avec $R^2 = 0.990$.

4.2 Détermination de la CMI de l'acide acétique :

La CMI de l'acide acétique qui empêche la formation de la turbidité a été obtenue à la quatrième dilution logarithmique de base 2, soit à la concentration de 0.125%. Donc, l'acide acétique utilisé à la plus faible concentration capable de dissoudre les dérivés à étudier (0.03125%) écarte la possibilité que cette solution interfère avec le résultat des différentes CMI.

Molarité des solutions acétiques de chacun des dérivés à 20% et à 80% de substitution :

- Le chitosan à 15% d'acétylation a été substitué à 20% ou à 80% par chacun des anhydrides acétique, butyrique et caproïque ;
- Masse molaire du chitosan à 15% d'acétylation : 70 000 ;
- A : masse molaire d'un monomère non acétylé,
A=189 ;
- n_A : nombre de moles du monomère non acétylé ;
- X_A : fraction molaire en monomère acétylé ;
- B : poids moléculaire d'un monomère acétylé,
B=231 ;
- n_B : nombre de moles du monomère acétylé ;
- Poids moléculaire d'un monomère butylé : 259 ;
- Poids moléculaire d'un monomère caprylé : 273.
- $X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B}$
- Poids moléculaire du chitosan = $n_A \times A + n_B \times B$

A partir de ces deux équations à deux inconnus, on détermine le nombre de monomères par molécule de chitosan, qui n'est autre que le nombre de monomères par molécule de chacun des dérivés :

$$N = 360.$$

Connaissant le nombre de monomères par molécule, le poids moléculaire de chacun des monomères, le degré d'acétylation et de substitution du chitosan, on détermine le nombre de moles par litre (molarité) de la solution à l'aide de l'équation suivante :

$$C_{(g/l)} = \text{Molarité}_{(mole/l)} \times \text{Poids Moléculaire}$$

Le tableau IV présente le poids moléculaire et le nombre de moles par litre de chacun des dérivés acétique, butyrique et caproïque à 20% et à 80% de d.d.s.. Il montre une faible différence entre la molarité des différentes solutions utilisées, ce qui permet la comparaison entre les différentes CMI.

	N-acétyl chitosan		N-butyryl chitosan		N-caproyl chitosan	
	20%	80%	20%	80%	20%	80%
Degré de substitution						
Poids moléculaire	73 332	82 404	75 348	90 486	76 500	95 076
M ($\times 10^{-3}$ mole/l)	0.043	0.038	0.042	0.035	0.041	0.033

Tableau IV : Concentration molaire des solutions à 3.2 mg/ml.

4.3 Détermination proprement dite de la CMI :

La lecture des résultats se fait en examinant les tubes à l'œil nu. La CMI correspond à la plus petite concentration de soluté capable d'empêcher l'apparition de la turbidité. Les différentes valeurs de CMI pour les trois dérivés à 20% et à 80% de substitution sont présentées dans les tableaux V, VI et VII.

La turbidité observée dans les tubes servant à la détermination de la CMI dépend de la croissance bactérienne. Un dérivé à une concentration inférieure à la concentration minimale inhibitrice n'inhibe pas la croissance bactérienne dans le milieu de culture MH liquide utilisé. Cette dernière est à l'origine de la turbidité apparente.

La concentration des dérivés ne joue pas un rôle dans l'apparition de la turbidité. Un polymère précipite normalement lorsque sa concentration en solution augmente. Dans le tube où la concentration en polymère est élevée (3.2 mg/ml), la croissance bactérienne est inhibée et le milieu correspondant est limpide, ce qui prouve que le polymère utilisé à des concentrations inférieures ou égales à 3.2 mg/ml n'est pas en mesure de provoquer la turbidité.

La solubilité des dérivés du chitosan dépend du degré de substitution. Le milieu acide dans lequel ces derniers sont solubles provoque la protonation des groupements amine primaire. Plus le degré de substitution est grand, plus le groupement amine est protégé par des groupements non-ionisables. Ainsi, la solubilité des dérivés devrait diminuer lorsque le degré de substitution augmente. L'étude de l'effet du degré de substitution sur la solubilité des dérivés à 3.2 mg/ml dans la solution acétique à 0.03125% permet de déduire son effet sur la turbidité des milieux de culture servant à la détermination de la CMI. L'observation de telles solutions à 35°C après 18 heures d'incubation montre l'absence de turbidité, donc de précipitation. Ces résultats prouvent que les dérivés à 20% et à 80% tels qu'ils sont utilisés n'affectent pas, par leur solubilité, les résultats de la CMI.

Les dérivés du chitosan, solubles dans l'acide acétique à 0.03125% (pH3.54), sont insolubles en milieu alcalin. L'incorporation de la solution acétique à 0.03125% de l'un de ces dérivés dans le milieu MH liquide tamponné à pH7.4 n'influence pas leur solubilité. Ceci est dû au pouvoir tampon du milieu qui maintient la neutralité du pH et empêche par la suite la précipitation des dérivés.

Le blanc servant à éliminer l'effet des différents dérivés sur l'apparition de la turbidité dans les tubes employés dans la détermination de la CMI, vient confirmer les données mentionnées ci-dessus. Quelle que soit la concentration du dérivé dans le milieu de culture MH liquide, l'incubation des tubes sans ajout d'inoculum pendant 16-18 heures à 37°C n'aboutit pas à l'apparition de la turbidité.

Degré de substitution (%)	CMI (mg/ml)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20	0.8	0.8
80	1.6	1.6

Tableau V: CMI du N-acétyl chitosan à 20% et à 80% de substitution

Degré de substitution (%)	CMI (mg/ml)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20	0.8	0.8
80	1.6	1.6

Tableau VI: CMI du N-butyryl chitosan à 20% et à 80% de substitution

Degré de substitution (%)	CMI (mg/ml)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20	0.8	0.8
80	1.6	1.6

Tableau VII: CMI du N-caproyl chitosan à 20% et à 80% de substitution

Au même degré de substitution, les trois dérivés étudiés semblent avoir la même CMI vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*, ceci pour un même degré de substitution. En d'autres termes, la CMI de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* est indépendante de la nature du groupement aliphatique substitutif utilisé.

La CMI passe du simple au double lorsque le degré de substitution passe de 20% à 80%. Autrement dit, le pouvoir inhibiteur d'un dérivé dépend de son degré de substitution : la CMI augmente lorsque le nombre de groupements substitutifs augmente. Le pouvoir inhibiteur diminue en conséquence. Ce fait peut être expliqué par le blocage des groupements amines primaires à l'aide des groupements substitutifs. La substitution des groupements amine primaires diminue le pouvoir polycationique du dérivé utilisé au fur et à mesure que le degré de substitution augmente. Ceci diminue le pouvoir agglutinant qui contribue à l'activité antimicrobienne du chitosan et de ses dérivés^{66, 67}.

4.4 Etude de la stérilisation des échantillons :

Dans les études de microbiologie *in vitro*, la stérilisation débarrasse l'échantillon à tester de tous les contaminants microbiens qui peuvent interférer avec les résultats.

Des études effectuées dans le but d'évaluer l'effet de la stérilisation sur les propriétés physiques du chitosan ont démontré que la chaleur sèche ou humide employées dans la stérilisation est susceptible d'éliminer certains groupements amines, de provoquer une dépolymérisation partielle et de créer des liaisons intramoléculaires croisées. La chaleur pourrait être à l'origine d'une réduction de la solubilité dans l'eau à travers un réarrangement significatif des chaînes¹⁰².

D'autres études ont passé en revue les différents procédés de stérilisation. Elles ont démontré que la stérilisation par les rayons γ provoque une réduction de la résistance mécanique des films du chitosan solubilisé dans l'acide acétique à 2%. Ceci serait dû à des changements dans la conformation des segments moléculaires qui résultent du clivage de la chaîne du chitosan. La molécule de chitosan subit une hydrolyse par les molécules d'eau résultant de la stérilisation par l'oxyde d'éthylène, véhicule de

l'humidité. La stérilisation à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde à 2% pendant trois jours semble être responsable d'un clivage de structure de la glucosamine¹⁰².

Tous ces effets, combinés à la nature visqueuse des échantillons disponibles, font de la filtration stérilisante le mode de stérilisation le moins nocif et le plus adapté aux besoins de cette étude.

La stérilisation à travers une membrane de 0.45 μm de porosité est principalement basée sur les faits suivants :

- La viscosité élevée rend impossible le passage des solutions à tester à travers une membrane de 0.22 μm .
- Les membranes à 0.45 μm de porosité laissent passer uniquement les bactéries dites « Pseudomonas-like ». Elles retiennent des bactéries dont la taille est inférieure au diamètre des pores à cause des liaisons van der Waals qui s'établissent entre la solution à filtrer et la membrane filtrante¹⁰³.
- Le risque de contamination des solutions dont on évalue l'efficacité microbiologique *in vitro* sont faibles. Les dérivés subissent durant leur synthèse, l'effet de plusieurs agents chimiques parmi lesquels : l'acide acétique à 10% (concentration > CMI), la solution méthanolique de diéthylamine 2N et l'alcool isopropylique. Dans les conditions d'utilisation décrites précédemment, ces produits sont considérés comme agents antibactériens et réduisent énormément les chances d'une éventuelle contamination microbienne. L'incubation de 100 mg de chacun des dérivés réduits en fibres dans 3 ml du milieu MH liquide à 35°C durant 18 heures laisse le milieu de culture parfaitement limpide, éliminant ainsi le doute de la stérilité des produits du départ.

Les échantillons testés microbiologiquement ont été préparés dans des conditions stériles : L'acide acétique glacial (à 99+%, lui-même stérile) servant à la préparation de la solution aqueuse à 0.3125% a été dilué à l'aide d'eau distillée stérile. Tout le travail relié à la détermination de la CMI a été effectué sous une hotte à flux d'air laminaire. La filtration à travers une

membrane stérile de 0.45 μm de porosité renforce l'hypothèse de stérilité des échantillons, tout en éliminant la possibilité d'une contamination à l'aide de particules solides inertes, survenue entre la préparation des fibres et le déroulement du test microbiologique.

Afin de confirmer l'hypothèse de stérilité des échantillons, une gamme de tubes blancs, correspondant aux différentes concentrations en dérivés testées sans ajout d'inoculum, montre l'absence de croissance microbienne. Ce résultat écarte la possibilité d'une croissance microbienne, en dehors de la croissance due à l'inoculum, qui pourrait fausser les résultats de l'étude.

IV. CONCLUSIONS

L'influence des solvants sur l'aspect et les propriétés physiques des fibres et des pellicules a été étudiée dans le but de choisir le mode de préparation des fibres le mieux adapté à l'élaboration d'une forme topique à base des dérivés alkylés du chitosan. Le rôle joué par ces dérivés dans l'infection bactérienne retardant la cicatrisation des plaies cutanées a été examiné.

Les dérivés préparés sont : le N-acétyl chitosan, le N-butyryl chitosan et le N-caproyl chitosan. La préparation consiste à faire réagir l'anhydride d'acide correspondant à chacun de dérivés avec le chitosan. Le degré de substitution de chacun des dérivés a été limité à 20% et à 80%. Il a été déterminé en se basant sur les données qui figurent dans le tableau II de la page 57. Le degré de substitution a été validé par spectroscopie RMN (^1H) d'un échantillon de N-butyryl chitosan à 50% de substitution.

La formation des fibres est possible en milieu faiblement alcalin par dispersion d'une solution diluée à l'eau distillée du milieu réactionnel de synthèse des dérivés. Le flux laminaire obtenu par rotation du bain coagulant d'une solution méthanolique de diéthylamine 2N est capable d'étirer et de précipiter les gouttelettes qui y sont versées. Le précipité récupéré par filtration est lavé plusieurs fois à l'alcool isopropylique. Un lavage supplémentaire à l'éther éthylique a aussi été fait.

La taille des fibres dépend de la nature des dérivés et des conditions expérimentales. L'aspect microscopique de leur structure fibreuse dépend du liquide de lavage. L'alcool isopropylique employé permet l'élimination de tous les solvants et les réactifs résultant de la synthèse et de la formation des fibres. Quand le lavage est limité à l'alcool isopropylique, les fibres formées se solvatent à cause des liaisons de faible énergie qui s'établissent entre les molécules des dérivés en question et l'alcool isopropylique. Un lavage supplémentaire à l'éther éthylique permet de déshydrater les fibres et de conserver leur structure fibreuse apte à la compression.

La formation des pellicules survient après le lavage des fibres à l'aide de l'un ou l'autre des solvants. Les fibres sont dispersées dans le solvant ayant servi à leur lavage, étalées sur un tamis de 200 « mesh » puis essorées par compression à l'aide d'une presse hydraulique à la pression de 2.3 tonnes métriques.

Un exemple de fibres et de pellicules de N-butyryl chitosan à 20% de substitution a été examiné pour leurs propriétés mécaniques ainsi que pour leur ultrastructure. Cet exemple a permis de constater que les pellicules lavées et dispersées à l'alcool isopropylique sont friables et faiblement résistantes à la déchirure. L'ultrastructure détectée par AFM montre des fibres fusionnées et parfaitement alignées. Le contraste de phase indique une structure hétérogène de ces pellicules.

De telles observations peuvent être tout de même expliquées par le phénomène de solvation qui provoque une perte de structure des fibres et le fusionnement des molécules.

Les pellicules lavées à l'éther éthylique sont nettement plus flexibles et plus résistantes à la déchirure. L'amélioration de ces propriétés est due à la structure fibreuse conservée après lavage et dispersion dans l'éther éthylique. L'ultrastructure des fibres est marquée par leur enchevêtrement et le contraste de phase est presque inexistant.

L'éther éthylique maintient donc la structure fibreuse des différents dérivés et n'altère pas leur composition.

Les dérivés acétique, butyrique, et caproïque en solution acide ont été testés dans le but d'évaluer *in vitro* leur propriétés anti-microbiennes.

Staphylococcus aureus et *Pseudomonas aeruginosa*, pris comme exemple de bactéries Gram positif et Gram négatif, sont sensibles aux différents dérivés à la concentration de 0.8 mg/ml lorsque la substitution porte sur 20% des groupements amines libres du carbone en C₂, et de 1.6 mg/ml lorsque la substitution porte sur 80% de ces mêmes groupements.

L'effet inhibiteur des dérivés du chitosan vis-à-vis des deux bactéries est indépendant de la nature du dérivé utilisé : il ne dépend que du degré de substitution.

L'effet inhibiteur serait dû à leurs propriétés communes : ces différents dérivés alkylés héritent leurs propriétés d'immobilisation cellulaire de leur molécule de base. Leur effet

anti-microbien devient plus prononcé lorsque le degré de substitution diminue. La propriété polycationique des dérivés à 20% de substitution est plus prononcée que celle des dérivés à 80% de substitution, ce qui renforce l'interaction entre les dérivés faiblement substitués et la surface chargée négativement des cellules microbiennes. Le pouvoir inhibiteur cellulaire est donc plus élevé pour les dérivés à 20% de substitution.

Les dérivés N-acétyl, N-butyryl et N-caproyl chitosan permettront une étude plus approfondie dans le domaine de la cicatrisation cutanée. Leur présentation sous une forme topique originale combinée à leur effet anti-microbien sont prometteurs.

Il serait aussi intéressant d'évaluer leur capacité d'affecter mécaniquement la cicatrisation d'une plaie, à l'aide d'une étude *in vivo* chez des animaux d'expérience.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cohen I.K., Diegelmann R.F., Lindblad W.J., Wound healing : biochemical and clinical aspects. (eds) W. B. Saunders Company, Philadelphia ; Montreal, 346, 1992.
2. Reese E., Betts R.F., A practical approach to infectious disease. (eds) Little, Brown and company, Boston ; Toronto, 122-125, 1996.
3. Clark R.A.F., Wound repair : overview and general considerations. The molecular and Cellular Biology of Wound Repair, (eds) Clark R.A.F. and Henson P.M., Plenum Press, New York, 3-50, 1996.
4. Schilling J.A., Wound healing. Surg. Clin. North Am., 56, 859-874, 1976.
5. Weigel P.H., Fuller G.M., LeBoeuf R.D., A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. J.Theor.Biol., 119, 219-234, 1986.
6. Grotendorst G.R., Chang T., Seppa H.E.J., et *al.*, Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. J. Cell. Physiol., 113, 261-266, 1983.
7. Seppa H.E.J., Grotendorst G.R., Seppa S.I., et *al.*, The platelet-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts. J. Cell. Biol., 92, 584-588, 1982.
8. Cohen K., Diegelmann R., Lindblad W.J., Wound healing : biochemical and clinical aspects. (eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia ; Montreal, 347, 1992.

9. Diegelman R.F., Cohen I.K., Kaplan A.M., The role of macrophages in wound repair : A review. *Plast. Reconstr. Surg.*, 68, 107-113, 1981.
10. Mustaers Steven E., Bishop Jill E., McGrouther, Laurent Geoffrey J., Mechanism of tissue repair : from healing to fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 29 (1), 6-7, 1997.
11. Gogia P.P., *Clinical Wound Management*. (eds) Slack Inc., Thorofare, N.J., 1-12, 1995.
12. Stevenson T.R., Mathes S.J. : Wound Healing. In : (eds) Miller T.A., Rowlands B.J., *Physiologic Basis of Modern Surgical Care*. St. Louis, CV Mosby, 1988, 1010-1013.
13. Peacock E.E. Jr, Collagenolysis, the other side of the equation. *World J. surg.*, 4, 297-302, 1980.
14. Doillon C.J., Dunn M.G., Bender E., et *al.*, Collagen fiber formation in tissue repair: Development of strength and toughness. *Coll. Rel. Res.*, 5, 481-492, 1985.
15. Mignatti P., Rifkin D.B., Welgus H.G., Parks W.C., Proteinase and tissue remodeling. In : *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Second edition, (eds) Clark R. A. F., Plenum Press, New York, 427-474, 1996.
16. Tenorio A., Jindrak K., Weiner M., et *al.*, Accelerated healing in infected wounds. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 142, 537-543, 1976.
17. Cohen K., Diegelmann R., Lindblad W.J., Wound healing : biochemical and clinical aspects. (eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia ; Montreal, 350, 1992.
18. Kloth Luther C., McCulloch Joseph M., Feedar Jeffrey A., Wound healing : Alternatives in Management. (eds) F.A. Davis, Philadelphia, ch 15, 302-321, 1990.

19. Ross R., The Fibroblast and Wound repair. *Biological Revue*, 43, 51-96, 1968.
20. Peacock E.E. Jr, Wound Repair. (eds) W.B. Saunders company, Philadelphia ; Toronto, 134-135, 1984.
21. Carrico T.J., Mehrhof A.I., Cohen I.K., Biology of wound healing. *Surg. Clin. North Am.*, 64, 721-733, 1984.
22. Stevenson T.R., Mathes S.J., Wound healing. In : *Physiologic Basis of Modern Surgical Care*, (eds) Miller TA, Rowlands BJ, St. Louis, Toronto : Mosby, 1010-1013, 1988.
23. Goodson W.H., Hunt T.K., Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J. Surg. Res.*, 22, 221-227, 1977.
24. Cruse P.J.E., Wasserdrug B.A., Seifter E., et *al.*, Immunostimulatory effects of arginine in normal and injured rats. *J. Surg. Res.*, 29, 228-235, 1980.
25. Goodson W.H., Hunt T.K., Wound healing and aging. *J. Invest. Dermatol.*, 73, 88-91, 1979.
26. Mutsaers Steven E., Bishop Jill E., McGrouther Gus, Laurent Geoffrey J., Mechanism of tissue Repair : from Wound Healing to Fibrosis. 29 (1), 14, 1997.
27. Cohen K., Diegelmann R., Lindblad W.J., Wound healing : biochemical and clinical aspects. (eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia ; Montreal, 500-509, 1992.
28. Diegelmann R.F., Bryant C.P., Cohen I.K., Tissue alpha-globulins in keloid formation. *Plast. Reconstr. Surg.*, 59, 418-423, 1977.

29. Gates Robert H., Wound Infections. In : Infectious Disease Secrets, (eds) Hanley and Belfus, Inc., Philadelphia, 312, 1998.
30. Peacock E.E. Jr, Wound Repair. (eds) W.B. Saunders company, Philadelphia, Toronto, 148-150, 1984.
31. Kloth Luther C., McCulloch Joseph M., Feedar Jeffrey A., Wound healing : Alternatives in Management. (eds) F.A. Davis, Philadelphia, ch9, 142-149, 1990.
32. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch 9, p 62-68, 1990.
33. Bauman B., Update your technique for changing dressings. Nursing, 12 (2), 68-71, 1982.
34. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch3, p20-24, 1990.
35. Vilais R., Essai de classification des médicaments à usage local dans la cicatrisation des lésions cutanées. De : Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, 145, 265-266, 1965.
36. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch11, p74-80, 1990.
37. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch 10, p 69-73, 1990.
38. Peacock E.E. Jr, Wound Repair. (eds) W.B. Saunders company, Philadelphia ;Toronto, 158, 1984.

39. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch 2, p 9-19, 1990.
40. Winter G.D., Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wound in the skin of the young domestic pig. *Nature*, 193, 293-294, 1963.
41. Hinman C.C. *et al.*, effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds. *Nature*, 200, 377-379, 1963.
42. Wilson I.A.I. *et al.*, The pH of varicose ulcer surfaces and its relationship to healing. *Vasa (Bern)*, 8, 339-342, 1979.
43. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch 4, 25-34, 1990.
44. Arndt K.A., Bowers K.E. and Chuttani A.R., *Manual of Dermatologic Therapeutics*. (eds) Little, Brown and Company, Boston, 349-351, 1995.
45. Kloth Luther C., McCulloch Joseph M., Feedar Jeffrey A., Wound healing : Alternatives in Management. (eds) F.A. Davis, Philadelphia, ch 9, 159-161, 1990.
46. Knighton D. *et al.*, Regulation of wound healing angiogenesis : effect of oxygen gradient and inspired oxygen concentration. *Surgery*, 90, 262-270, 1981.
47. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch5, 35-41, 1990.
48. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch6, 43-49, 1990.

49. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch7, 50-54, 1990.
50. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch8, 55-61, 1990.
51. Hermans M.H.E. and Hermans R.P., Preliminary report on the use of a new hydrocolloid dressing in the treatment of burns. Burns, 11, 125-129, 1984.
52. Thomas S., Wound Management and Dressing. (ed) The Pharmaceutical Press, London, ch12, 85, 1990.
53. Dodgen P.W., et *al.* : The effects of electrical stimulation on cutaneous oxygen supply in diabetic older adults. Phys. Ther., 67 (5), 793, 1987.
54. Kloth Luther C., McCulloch Joseph M., Feedar Jeffrey A., Wound healing : Alternatives in Management. (eds) F.A. Davis, Philadelphia, ch12, 221-258, 1990.
55. Kloth Luther C., McCulloch Joseph M., Feedar Jeffrey A., Wound healing : Alternatives in Management. (eds) F.A. Davis, Philadelphia, ch13, 259-286, 1990.
56. Kloth Luther C., McCulloch Joseph M., Feedar Jeffrey A., Wound healing : Alternatives in Management. (eds) F.A. Davis, Philadelphia, ch14, 287-301, 1990.
57. Rouget C., C R Acad Sci Ser, III, 48, 792-795, 1859.
58. Keisuke K., Desk Reference of functional Polymers, Syntheses and Applications. (eds) Imperial College of Science, Technology and Medicine, University of London, 239-259, 1996.
59. Roberts G.A.F., Chitin chemistry. (eds) The MacMillan Press LTD, 280-281, 1992.

60. Hirano S., Ohe Y. et Ono H., Selective N-acylation of chitosan. *Carbohydrate research*, 47, 315-320, 1976.
61. Gueddi Mohammed, Étude des dérivés de la chitosane et leur intérêt en technologie pharmaceutique. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, 1999.
62. Dodane Valérie and Viviliam Vinod D., Pharmaceutical Applications of Chitosan. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1 (6), 246-253, 1998.
63. Muzzarelli and Muzzarelli, Polysaccharides. (eds) Severian dimitriu, 611-613, Marcel Dekker inc., 1998.
64. Nishimura K., Nishimura S., Seo H., Nishi N., Tokura S., Azuma I., Effect of multiporous microspheres derived from chitin and partially deacetylated chitin on the activation of mouse peritoneal macrophages. *Vaccine*, 5, 136-140, 1987.
65. Muzzarelli R., Chitin and Chitosan. (eds) Skjåk-Bræk G., Anthonsen T. and Stanford P., 25-33, Elsevier Science, 1989.
66. Young D.H., Kohle H., Kauss H.. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant. Physiol.*, 70, 1449-1454, 1982.
67. Young D.H., Kauss H., Release of calcium from suspension-cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effects on membrane permeability. *Plant. Physiol.*, 73, 698, 1983.
68. Sudarshan N.R., Hoover D.G., Jnorr D., Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6 (3), 257-272, 1992.

69. Muzzarelli R., Tarsi R., Fillipini O., Giovanetti E., Biagini G., Varaldo P.E., Antimicrobial Properties of N-Carboxybutyl Chitosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 2019-2023, 1990.
70. Cuero R.G., Antimicrobial action of exogenous chitosan. *EXS*, 315-333, 1999.
71. Olsen R., Schwartzmiller D., Weppner W., Winandy R., Biomedical Applications of Chitin and its Derivatives, Chitin in nature and technology. (eds) Skjåk-Bræk G., Anthonsen T. and Stanford P., 813-828, Elsevier Science, 1989.
72. Lahiji A., Sohrabi A., Hungerford D.S., Frondoza C.G., Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *Journal of biomedical Materials Research*, 51 (4), 586-595, 2000 Sep 15.
73. Risbud M., Hardikar A., Bhonde R., Chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as candidate for islet immunoisolation : in vitro biocompatibility evaluation. *Cell Transplantation*. 9 (1), 25-31, 2000 Jan-Feb.
74. Costain D.J., Kennedy R., Ciona C., McAlister V.C., Lee T.D.G., Prevention of postsurgical adhesions with N,O-carboxymethyl chitosan : Examination of the most efficacious preparation and the effect of N,O-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing. *Surgery*, 121 (3), 314-319, 1997.
75. Biagini G., Bertani A., Muzzarelli R., Damadei A., DiBenedetto G., Belligolli A. and Ricotti G., Wound management with N-carboxybutyl chitosan. *Biomaterials*, 12, 281-286, 1991.

76. Mattioli Belmonte M., DeBenedittis A., Mongiorgi R., Gandolfi MG., Giardino R., Biagini G., Valdre G., Muzzarelli R., Prati C., Dolci G., Bioactivity of chitosan in dentistry. Preliminary data on chitosan-based cements, *Minerva Stomatologica*. 48 (12), 567-576, 1999 Dec.
77. Nagasawa K., Watanabe H., Ogano A., Ion-Exchange Chromatography of Nucleic Acid constituents on chitosan-impregnated cellulose thin layers. *Journal of chromatography*, 47, 408, 1970.
78. Uragami T., Yoshida F., Sugihara M., Active Transport of Chlorine Ions through Crosslinked Chitosan Membranes. *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, 4, 99-102, 1983.
79. Uragami T., Takigawa K., Permeation and separation characteristics of ethanol-water mixtures through chitosan derivative membranes by pervaporation and evaporation. *Polymer*, 31, 668, 1990.
80. Senstad C., Mattiasson B., Affinity-Precipitation Using Chitosan as Ligand Carrier. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 216, 1989.
81. Cuero R.G., Osuji G., Washington A., N-carboxymethylchitosan Inhibition of Aflatoxin Production : Role of Zinc. *Biotechnology Letters*, 13 (6), 441-444, 1991.
82. Struszyk H., Pospieszny H. and Kotlinsky S., Chitin and Chitosan. (eds) Skjåk-Bræk G., Anthonsen T. and Stanford P., 733-742, Elsevier Science, 1989.
83. Fukuda Y., Kimura K and Ayaki Y., Effect of Chitosan Feeding on Intestinal Bile Acid Metabolism in Rats. *Lipids*, 26, 395-399, 1991.

84. Muzzarelli R.A.A., The Polysaccharides. (eds) G.O. Aspinall, vol.3, 417-450, Academic Press, New York, 1986.
85. Nauss J.L., Thompson J.L., Nagyvary J., The Binding of Micellar Lipids to Chitosan. *Lipids*, 18, 714-718, 1983.
86. Brzaski M.M., Wojtasz-Pajak A., Ramisz A., Implementation of antarctic krill chitosan in veterinary practice. In : *Chitin and Chitosan*, (eds) Skjåk-Bræk G., Anthonsen T. and Stanford P., 79-86, Elsevier Science, 1989.
87. Muzzarelli R., Biagini G., Damadei A., Pugualoni A., Da Lio J., Chitosans and other polysaccharides as wound dressing materials. In : *Biomedical and biotechnological polysaccharides*, (eds) Crescenzi V., Stivala S.S., 109-119, 1990.
88. Ohshima Y., Nishino K., Yonekura Y., Kishimoto S., Wakabayashi S., Clinical Application of Chitin non-Woven Fabric as Wound Dressing. *European Journal of Plastic Surgery*, 10, 66-69, 1987.
89. Salmon S., Hudson S.M., Shear-Precipitated Chitosan Powders, Fibrils, and Fibril papers : Observations on their Formation and Characterisation. *Journal of Polymer Science : Part B : Polymer Physics*, 33, 1007-1014, 1995.
90. Doczi J., Process for purification of chitosan by means of salicylic acid salt thereof. U.S.2, 795, 579, 1957.
91. Rahmouni Miloud, Préparation de N-acyle et N-aryle chitosane. Étude de leur propriétés sur la libération de l'acétaminophène. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, 1997.

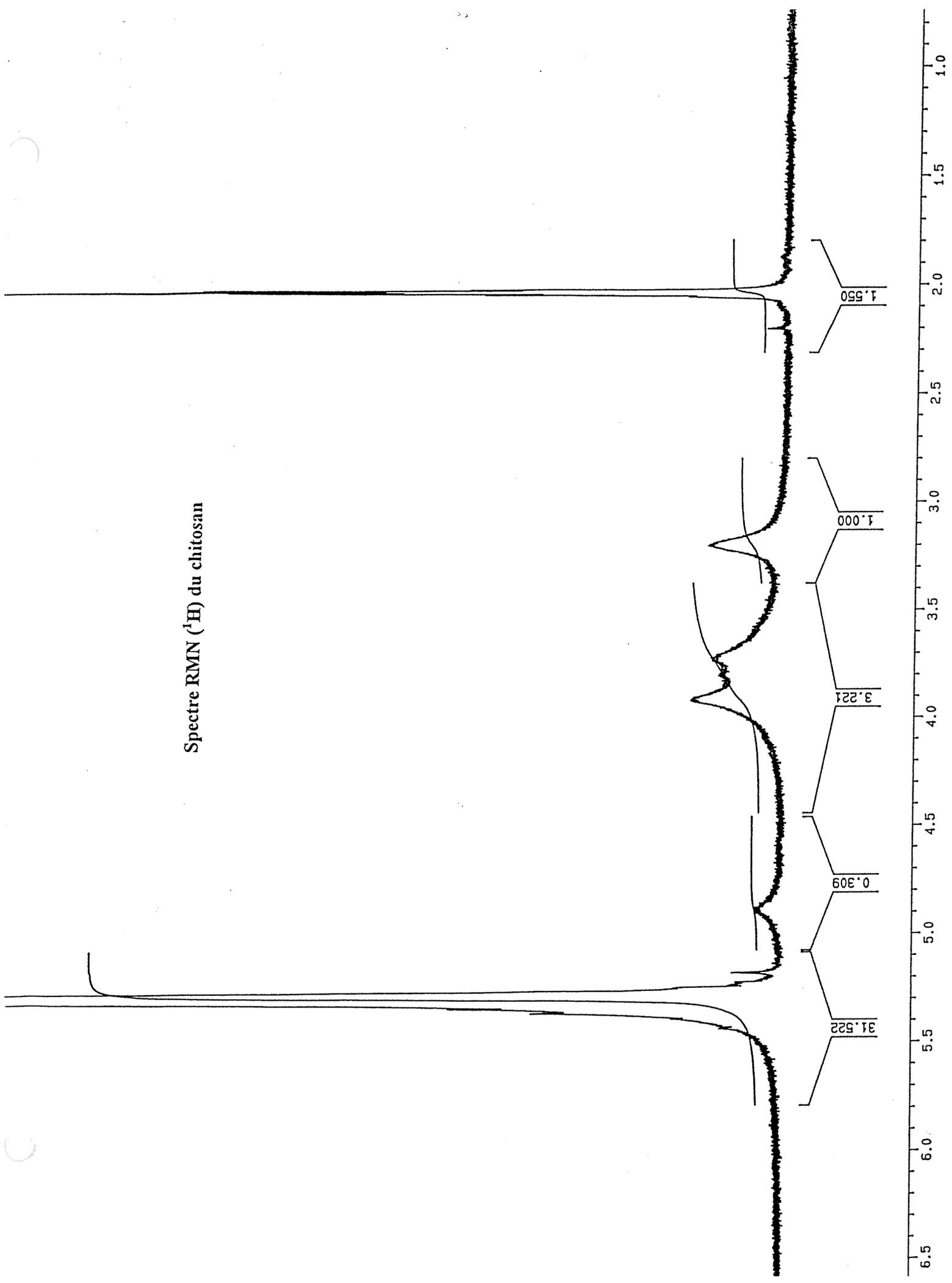
92. Lal, Ratneshwar, and Scott A.J.. Biological applications of atomic force microscopy. *American Journal of Physiology*, 266, C1-C21, 1994.
93. Christol D., Savoir interpréter les analyses bactériologiques et les épreuves de sensibilité aux antibiotiques. (eds) G.I.A.-Éditeur, Paris, 102-103, 1978.
94. Atlas R.M., Parks L.C., Handbook of Microbiology Media. (eds) CRC Press, Florida, 629, 1993.
95. Baron E.J., Peterson L.R., Finegolo S.M., Diagnostic Microbiology. (eds) Mosby-Year Book, St. Louis, 138, 1994.
96. Murray P.G., Wood W.A., Krieg N.R., Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington D.C., 262-264, 1994.
97. Henry John Bernard, Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. (eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1174-1176, 1996.
98. Block S.S., Disinfection, Sterilisation, and Preservation. (eds) Lea &Febiger, Philadelphia.London, 60, 1991.
99. Atlas R.M., Bartha R., Microbial Ecology : Fundamentals and Applications. (eds) Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, Menlo Park, California, 158, 1981.
100. Paul Arnaud. Chimie physique, (eds) Dunod, Paris, 244-255, 1998
101. American Chemical Society. Division of polymeric materials : Science and engineering, Hydrophilic Polymers : Performance with Environmental Acceptance. (eds) American Chemical Society, Washington, DC, 113-123, 1996.

- 102.** Rao S.B., Sharma C.P., Sterilization of chitosan : Implications. Journal of Biomedical Application, 10, 136-143, 1995 Oct.

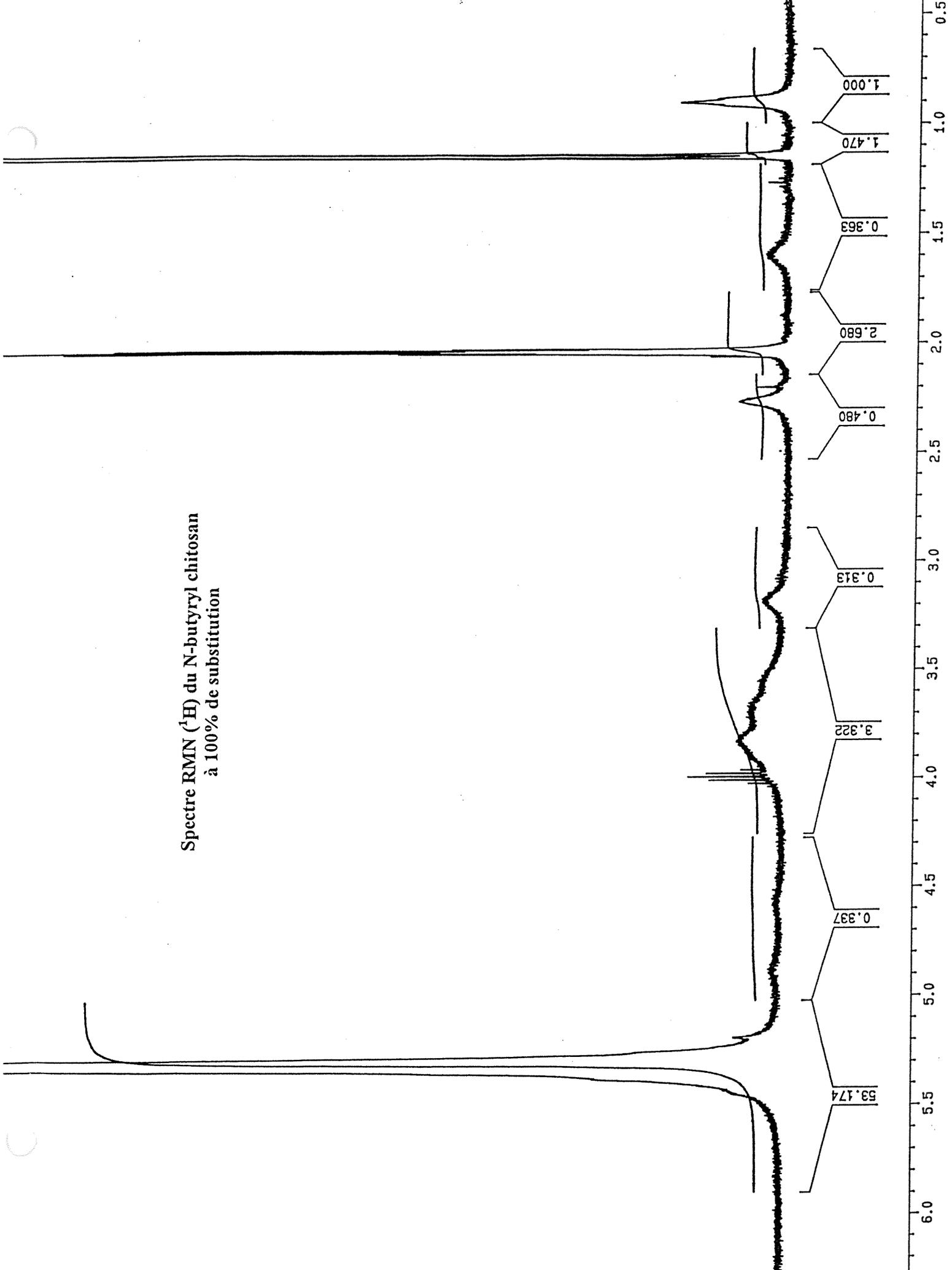
- 103.** Mahon C.R., Manuselis G., Textbook of Diagnostic Microbiology.
(eds) W.B. Saunders Company, Philadelphia. London. Toronto. Montreal, 20, 2000.

ANNEXE

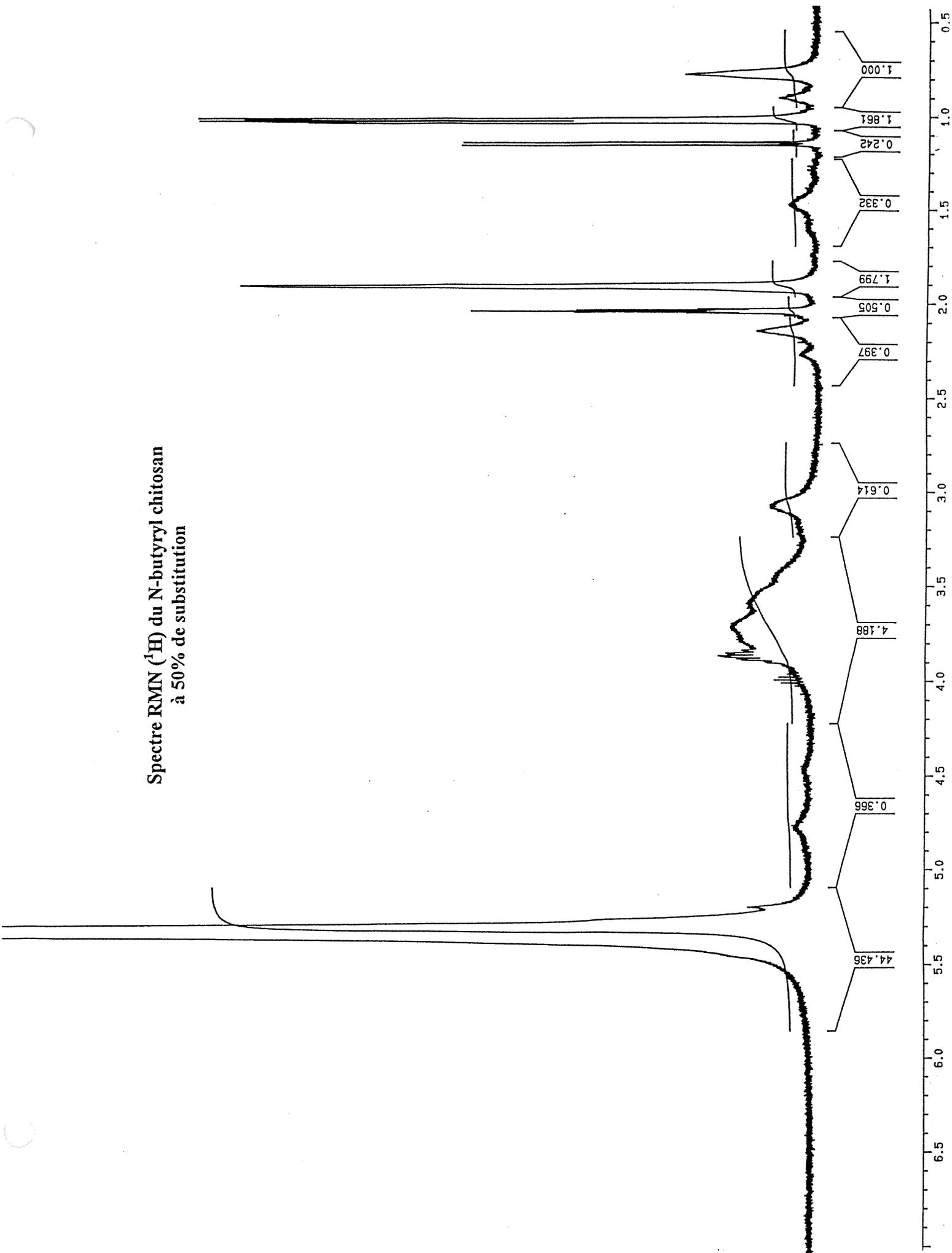
Spectre RMN (^1H) du chitosan



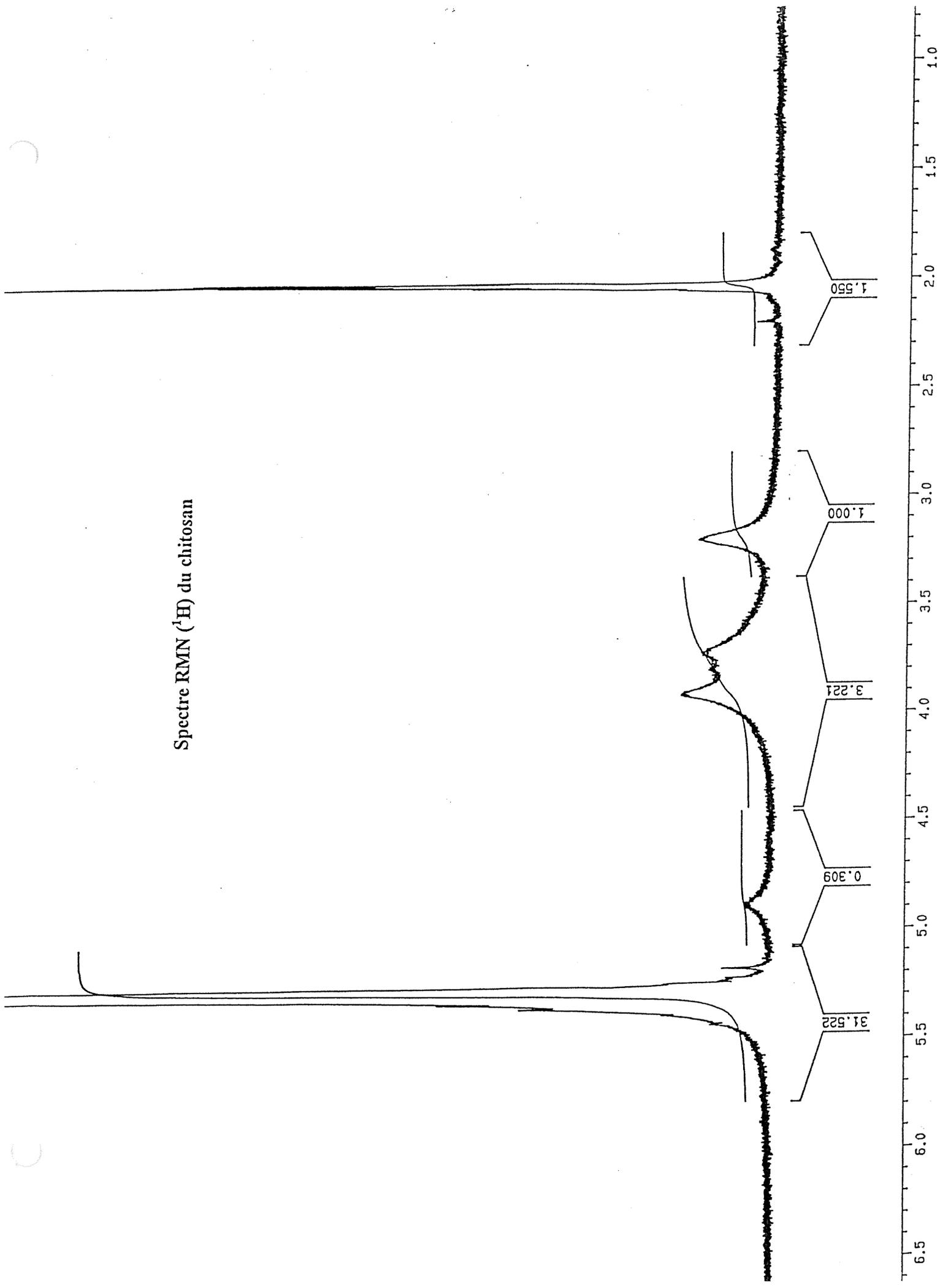
Spectre RMN (^1H) du N-butyryl chitosan
à 100% de substitution



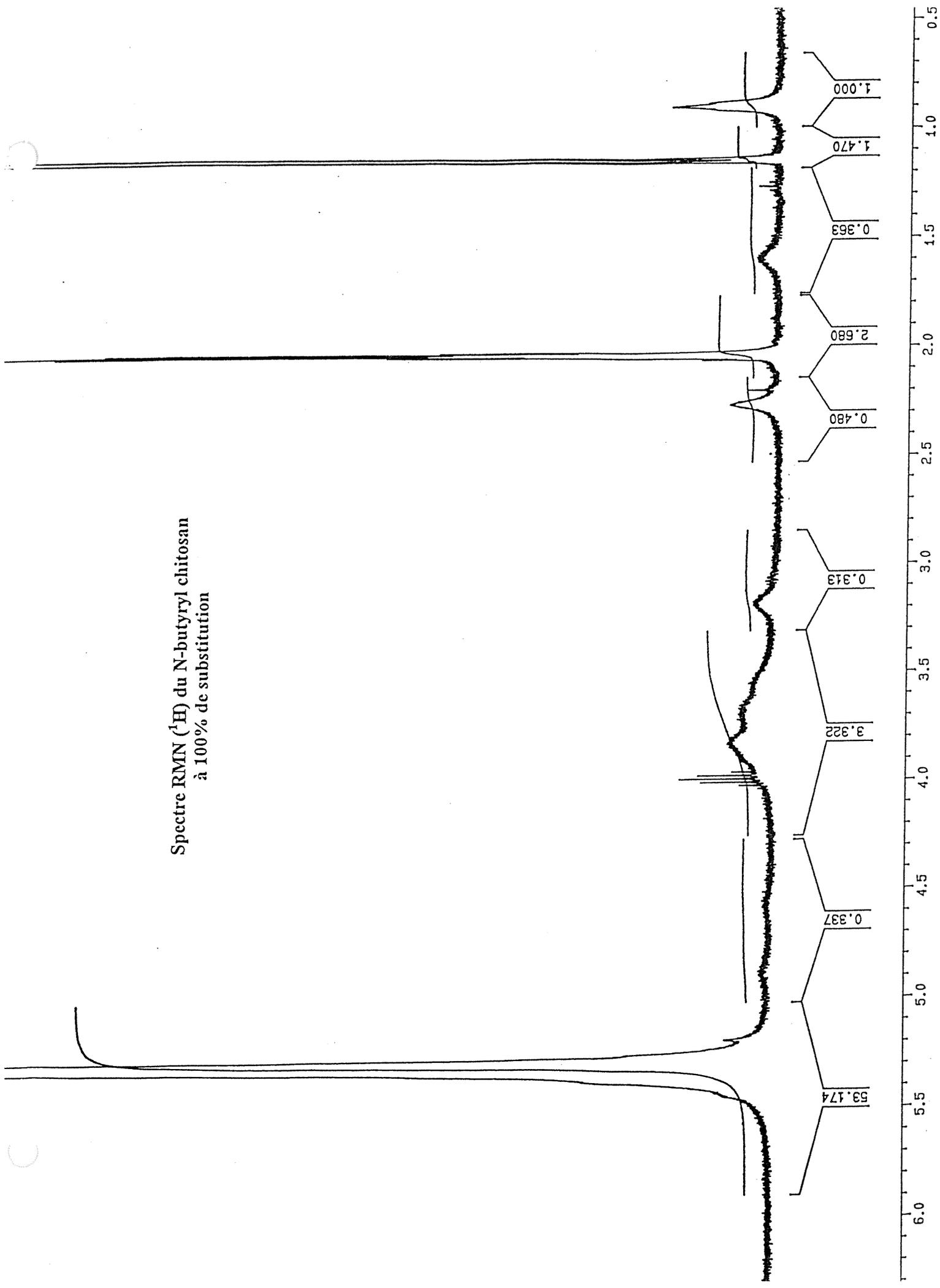
Spectre RMN (^1H) du N-butyryl chitosan
à 50% de substitution



Spectre RMN (^1H) du chitosan



Spectre RMN (^1H) du N-butyryl chitosan
à 100% de substitution



Spectre RMN (^1H) du N-butyryl chitosan
à 50% de substitution

