

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MATÉRIAUX À BASE DE PROTÉINES AVEC APPLICATIONS BIOMÉDICALES.
LA FIBROÏNE DE SOIE COMME SUPPORT POUR CULTURES CELLULAIRES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE - CONCENTRATION BIOCHIMIE

PAR
FRÉDÉRIC BYETTE

Août 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je profite de cette section pour remercier les personnes et organismes qui m'ont aidé, appuyé ou encouragé à persévérer tout au long de ma maîtrise, contribuant ainsi à la réussite des projets et à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Mircea Alexandru Mateescu, et mes co-directrices, Muriel Subirade (projet soja) et Isabelle Marcotte (projet fibroïne), de m'avoir accueilli dans leurs équipes de recherches respectives et de m'avoir soutenu tout au long de mon cheminement. Merci pour votre bienveillance, votre encadrement et votre compréhension. Merci à Isabelle d'avoir cru en moi et de m'avoir motivé à reprendre les études. Merci aussi à Mircea de m'avoir repris dans son équipe après une longue interruption. Sans vous ce document n'existerait pas. Un merci particulier aux professeurs Christian Pellerin et Joanne Paquin pour leur soutien technique et judicieux conseils apportés dans l'étude sur les biomatériaux à base de fibroïne.

Je remercie aussi les organismes m'ayant soutenu financièrement pour l'avancée des projets, soit le conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour le projet avec les protéines de soja ainsi que Pharmaqam et le groupe de recherche axée sur la structure des protéines (GRASP) pour le projet sur les biomatériaux à base de fibroïne.

Un grand merci à mes collègues de laboratoire et amis de l'université qui m'ont offert leur support moral et/ou technique dans les difficultés rencontrées. Je cite ici Alexandre Arnold, Marc Lemieux, Élias Assaad, Carmen Calinescu, Wilms E. Baille, Étienne Chartrand, Andrée Gravel, Frédéric Bouchard et Frantz LeDevedec.

Je remercie aussi deux médecins exceptionnels qui ont su prendre les bons choix pour me garder en vie, et donc permettre à tout ceci de se réaliser, Dr. Jeremy Sturgeon et Dr. Simon Tanguay.

Enfin je tiens à remercier les personnes occupant une place privilégiée dans mon cœur et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, soit mes amis personnels et ma famille. Merci à Maryse et la famille Paré pour leur soutien moral et

financier. Je vous aurai considéré comme ma famille durant les dix dernières années et je vous respecte beaucoup. Merci à Frank, mon ami que je considère comme un frère. Ta présence et tes encouragements dans les moments difficiles tout au long de mon épopée auront été une source de réconfort et de motivation inestimable. Je me considère chanceux de t'avoir comme ami bro. Merci à Nathalie d'avoir été là pour me supporter et m'encourager à progresser tout en étant si patiente. Tu es une remarquable source de motivation; je t'aime. Finalement, mes remerciements les plus sincères à mes parents et beaux-parents Carole & Michel et Serge & Francine, pour votre support moral et financier. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé à faire ce que je désirais au moment où je le voulais.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS.....	xiii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
CONTEXTE THÉORIQUE.....	6
1.1 Les biomatériaux.....	6
1.1.1 Définition et généralités.....	6
1.1.2 Concepts importants dans la science des biomatériaux	8
1.2 L'ingénierie tissulaire.....	10
1.2.1 Définition et généralités.....	10
1.2.2 Les matrices et l'ingénierie tissulaire.....	12
1.3 Les biomacromolécules pour la production de biomatériaux.....	16
1.3.1 Avantages et inconvénients.....	16
1.3.2 Les protéines fibreuses.....	16
1.3.3 La fibroïne du ver à soie <i>Bombyx mori</i> dans la préparation de biomatériaux	18
1.4 Problématique, hypothèses de recherche et objectifs.....	23
CHAPITRE II	
ASPECTS THÉORIQUES DES MÉTHODES ET TECHNIQUES UTILISÉES DANS LE PROJET DE RECHERCHE	27
2.1 Méthode de purification et de solubilisation de la fibroïne de soie.....	27
2.2 La confection de matrices 3D à base de fibroïne par lyophilisation	27
2.3 Méthodes de caractérisation des treillis tridimensionnels à base de fibroïne de soie.....	29
2.3.1 Morphologie et propriétés mécaniques	30

2.3.2	Caractérisation de la structure moléculaire.....	33
2.4	Fonctionnalité des biomatériaux à base de fibroïne de soie.....	38
2.4.1	Culture cellulaire et étude de viabilité.....	38
2.4.2	Microscopie confocale à balayage laser.....	41

CHAPITRE III

CELL-CULTURE COMPATIBLE SILK FIBROIN SCAFFOLDS CONCOMITANTLY PATTERNED BY FREEZING CONDITIONS AND SALT CONCENTRATION.....		43
3.1	Résumé.....	44
3.2	Abstract.....	45
3.3	Introduction.....	46
3.4	Materials and methods.....	48
3.4.1	Preparation of silk fibroin aqueous solution.....	48
3.4.2	Silk fibroin scaffolds processing.....	48
3.4.3	Swelling ratio and water uptake measurements.....	49
3.4.4	Mechanical properties.....	49
3.4.5	Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD).....	50
3.4.6	Attenuated total reflectance (ATR) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy.....	50
3.4.7	Cell culture.....	50
3.4.8	Confocal laser scanning microscopy.....	51
3.5	Results and discussion.....	51
3.5.1	Scaffolds processing and morphology.....	51
3.5.2	Evaluation of the molecular structure of the scaffolds.....	58
3.5.3	P19 cell culture in fibroin scaffolds.....	61
3.6	Conclusions.....	65
3.7	Acknowledgements.....	66

CHAPITRE IV

UTILISATION DE PROTÉINES DE SOJA ET D'AMIDON RICHE EN AMYLOSE DANS LA PRÉPARATION D'EXCIPIENTS POUR FORMULATIONS PHARMACEUTIQUES.....		67
4.1	Introduction.....	67
4.2	Hypothèses et objectifs.....	69

4.3 Matériel et méthode.....	70
4.3.1 Préparation des excipients.....	70
4.3.2 Propriétés d'écoulement des poudres.....	71
4.3.3 Solubilité des protéines.....	71
4.3.4 Contenu en eau.....	72
4.3.5 Dureté des comprimés.....	72
4.3.6 Profils de libération.....	72
4.4 Résultats et discussion.....	73
4.5 Conclusion.....	82
CHAPITRE V	
DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	84
ANNEXE A	
AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES EFFECTUÉES DANS LE CADRE DU STAGE DE MAÎTRISE.....	89
RÉFÉRENCES	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Paradigme principal utilisé en ingénierie tissulaire.....	11
Figure 1.2	Schéma d'une matrice 3D utilisée pour induire l'infiltration des cellules et la formation de tissu après son implantation.	13
Figure 1.3	Schéma d'une matrice 3D pré-vascularisée in vivo avant l'injection de cellules.....	13
Figure 1.4	Schéma de formation de matrice 3D par injection d'une solution polymérisable en milieu physiologique.....	14
Figure 1.5	Schéma d'une matrice 3Densemencée de cellules avant l'implantation dans le système physiologique.	15
Figure 1.6	a) Photographie d'un ver à soie Bombyx mori tissant son cocon protecteur, b) Image d'une fibre de soie captée par MEB (Shao et Vollrath, 2002) et c) Agencement en feuillets β de la fibroïne.	18
Figure 1.7	Représentation schématique du processus d'assemblage et de formation des fibres de soie.	19
Figure 1.8	Méthodes principales utilisées et types de matériaux engendrés à partir de solutions aqueuses de fibroïne de soie.....	21
Figure 2.1	Schéma de la congélation directionnelle d'une solution polymérique.	29
Figure 2.2	Représentation schématique des propriétés mécaniques mesurées par compression sur un cylindre et exemple de courbe obtenue. Le module de compression E (N/m ²) correspond à la pente de la droite dans la zone linéaire de compression.	32
Figure 2.3	Schéma de modules d'ATR utilisés en spectroscopie FTIR. Le poids permet un meilleur contact entre l'échantillon et le cristal.	34

Figure 2.4	Spectre FTIR-ATR indiquant les trois bandes amides principales de la fibroïne extraite de la soie des fibres formant les cocons de <i>Bombyx mori</i>	35
Figure 2.5	Représentation de la diffraction des rayons X par des plans successifs telle que démontrée par la loi de Bragg.....	37
Figure 2.6	Schéma simplifié du fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser.	41
Figure 3.1	Scaffolds processing flowchart.....	52
Figure 3.2	SEM micrographs of cross sectioned freeze-dried scaffolds prepared by freezing at -22°C with or without NaCl addition. The upper (a-e) and lower (f-j) row scale bars are 500 and 200 µm, respectively.	53
Figure 3.3	SEM micrographs of cross sectioned freeze-dried scaffolds prepared by freezing at -73°C with or without NaCl addition. The upper (a-e) and lower (f-j) row scale bars are 500 and 200 µm, respectively.	54
Figure 3.4	High magnification SEM micrographs of cross-sectioned freeze-dried scaffolds prepared by freezing at -73°C with a, 50; b, 75; c, 100 and d, 250 mM NaCl added before freezing. Scale bars represent 50µm.	55
Figure 3.5	Mechanical properties of processed scaffolds. Values are averages ± standard deviation (N=3).....	58
Figure 3.6	FT-IR spectra of freeze-dried silk fibroin scaffolds prepared: without methanol treatment nor salt at a) -73°C and b) -22°C; c) without methanol treatment and with 250 mM NaCl at -22°C; d) with methanol treatment and without salt at -73°C and e) with methanol treatment and without salt at -22°C. Spectrum f represents degummed silk fibroin threads.	59
Figure 3.7	X-ray diffraction patterns of freeze-dried silk fibroin scaffolds (no added salt) without (a and b) and with a methanol treatment (c and d). Scaffolds were prepared at -73°C for patterns a and c and at -22°C for b and d. Pattern e represents degummed silk fibroin threads.	61

Figure 3.8	Confocal microscopy images of P19 cells seeded in freeze-dried silk fibroin scaffolds. Cells were labeled with CFSE to permit their visualization by green fluorescence. A second staining with propidium iodide, done at the end of the culture, marked dead cells with yellow-orange fluorescence. Propidium iodide also tinted the scaffold matrix in brilliant red, allowing appreciating cell and matrix organization. Images show cell distribution at the surface of scaffolds (at the cell-seeded side).....	63
Figure 3.9	Reconstituted 3D confocal microscopy images illustrating the capacity of P19 cells to penetrate into scaffolds processed without NaCl at -73°C (a), and with 50 mM NaCl at -73°C and -22°C (b and c, respectively). The green CFSE fluorescence was color-coded as a function of the distance of the fluorescing cells within the scaffold, with the slide surface being at 0 µm. The penetration profiles of the other scaffolds resembled those of (b) and (c).....	64
Figure 4.1	Images de MEB des particules d'excipients obtenues par les différentes méthodes de préparation et séchage.	74
Figure 4.2	Pourcentage de solubilité des excipients en fonction des méthodes de préparation.....	76
Figure 4.3	Dureté des comprimés préparés par compression des différents excipients sans actif.....	79
Figure 4.4	Profils de libération de HQN dans le SGF (2h) et SIF a) en absence d'enzyme et b) en présence d'enzymes digestives.	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Applications et nature de biomatériaux utilisés dans le domaine biomédical.....	7
Tableau 1.2	Liste de différentes protéines fibreuses, de leurs motifs d'acides aminés les plus récurrents, de la structure secondaire résultante, et de leur présence dans la nature	17
Tableau 3.1	Swelling ratio and water uptake values of freeze-dried silk fibroin scaffolds	57
Tableau 4.1	Densité avant et après tassage, indice de compressibilité et rapport de Hausner des différents excipients.....	75
Tableau 4.2	Pourcentage massique d'eau totale, liée et libre dans les différents excipients.....	78

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3D :	Tridimensionnel
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Ala :	Alanine
ARA :	Amidon riche en amylose
Arg:	Arginine
ARN :	Acide ribonucléique
Asp :	Acide aspartique
At :	Atomisé
BMP :	<i>Bone morphogenic proteins</i>
CFSE :	5(6)-Carboxyfluorescein diacetate <i>N</i> -succinimidyl ester
FTIR-ATR :	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée (<i>Attenuated total reflectance Fourier transform infrared</i>)
Gln :	Glutamine
Gly :	Glycine
HQN :	8-Hydroxyquinoline hémisulfate hémihydrate
Lyo :	Lyophilisé
MEB :	Microscopie électronique à balayage
Mec :	Mécanique
Mix :	Produits mélangés
NaCl :	Chlorure de sodium
P19 :	Cellules souches embryonnaires de carcinome
PEO :	Oxyde de polyéthylène
Phe:	Phénylalanine
PI :	Iodure de propidium
Pro :	Proline sauf dans le Ch IV où l'abréviation Pro représente Prolisse
Ser:	Sérine
SGF:	<i>Simulated gastric fluid</i>

SIF:	<i>Simulated intestinal fluid</i>
Tyr:	Tyrosine
Val :	Valine
XRD :	Diffraction des rayons X

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

μm	Micromètre
A	Aire
d	Distance
E	Module de compression
F	Force
Kp	Kilopond
l	Longueur
m	Mètre
N	Newton
nm	Nanomètre
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
T	Température
V	Volume
W_d	Masse d'une matrice 3D sèche
W_s	Masse d'une matrice 3D gonflée d'eau
Δ	Delta (pour désigner une variation)
ε	Déformation
θ	Thêta (pour désigner un angle)
λ	Lambda (pour désigner une longueur d'onde)
σ	Contrainte

RÉSUMÉ

La fibroïne de soie extraite des fibres de cocons de vers à soie *Bombyx mori* a été utilisée dans une vaste gamme d'applications telles que la culture cellulaire, la régénération de tissus osseux et la libération contrôlée de molécules actives. Le choix de cette protéine fibreuse pour la conception de biomatériaux voués à l'ingénierie tissulaire est motivé par leurs impressionnantes propriétés mécaniques, leur biocompatibilité et leur biodégradabilité. Le but du projet de recherche principal présenté dans ce mémoire était de préparer des matériaux poreux à base de fibroïne de soie séricicole pour créer une matrice 3D utilisable comme support pour culture cellulaire *in vitro*. Dans cette optique, l'impact de l'addition de NaCl (0-250 mM) dans les solutions de fibroïne avant la congélation ainsi que l'effet de la température de congélation (-22°C ou -73°C) ont été étudiés lors de la préparation de matrices 3D lyophilisées. Les matériaux ont ensuite été traités au méthanol pour induire leur insolubilité, puis immergés dans l'eau pour extraire le sel. Tel qu'observé par microscopie électronique à balayage (MEB), la morphologie des matrices préparées à -22°C est constituée d'un réseau poreux interconnecté devenant moins serré avec l'ajout de sel. Les biomatériaux préparés à -73°C possèdent plutôt une structure en feuillets orientés sur lesquels des filaments et micropores sont apparus lors de l'addition de sel. Aux deux températures de congélation, les matrices ont affiché un ratio de gonflement plus élevé et une résistance à la compression plus faible lors de leur préparation en présence de sel. Les différences morphologiques des matrices ont été corrélées avec les variations dans les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace lors de la congélation. L'étude des matériaux par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et diffraction des rayons X (XRD) a révélé un changement dans la structure secondaire de la fibroïne, passant d'un mélange d'hélices α et pelotes statistiques dynamiques, vers une structure majoritairement en feuillets β induite par le traitement au méthanol. Aucune différence n'a cependant été observée en fonction de l'ajout de sel ou de la variation de la température de congélation. La microscopie confocale à balayage laser a permis de constater que des cellulesensemencées dans les matrices demeuraient viables et avaient pénétré la majorité des biomatériaux pour s'organiser en agrégats après 24 h de culture. Cette étude permet de conclure qu'il est possible d'adapter la morphologie de matrices 3D lyophilisées pour une utilisation comme support pour culture cellulaire. Aussi, un second projet de recherche présenté dans ce mémoire aura permis d'évaluer le potentiel d'utilisation d'un isolat de protéines de soja mélangé à l'amidon riche en amylose (ARA) pour la production d'un excipient pharmaceutique visant la libération de molécules actives par voie orale. Les résultats de libération de la 8-hydroxyquinoline (HQN) comme traceur ont montré que l'ajout d'ARA gélatinisé n'améliore pas le comportement de l'isolat de protéines de soja Pro, cependant l'ajout de Pro semble plutôt améliorer les propriétés de l'ARA gélatinisé comme excipient. La Pro ajoutée aux formulations d'ARA a apparemment favorisé la cohésion des particules en milieux digestifs simulés, présentant un potentiel d'additif liant dans les formulations.

Mots clés : fibroïne de soie, matrices 3D, culture cellulaire, lyophilisation, cristaux de glace, chlorure de sodium, température de congélation, isolat de protéines de soja, amidon

INTRODUCTION

L'avènement de la science des biomatériaux telle que connue aujourd'hui date d'une cinquantaine d'années environ. Durant cette courte période, ce domaine a grandement évolué, passant de l'utilisation unique de matériaux considérés inertes pour restaurer des fonctions mécaniques (prothèses dans le domaine biomédical) ou favoriser la guérison de plaies (sutures), vers une branche de matériaux plus sophistiqués visant la formation de tissus ou organes *in vitro* destinés à une implantation *in vivo* ultérieure.

Cette évolution, motivée par la nécessité de comprendre les interactions biomatériau-tissus, a donné naissance à l'ingénierie tissulaire, un domaine d'application des biomatériaux visant à favoriser la restauration ou la régénération de tissus ou organes dans un système ou un organisme biologique ayant subi un traumatisme ou présentant une malformation. Les biomatériaux utilisés en ingénierie tissulaire sont généralement des matrices 3D poreuses constituées de polymères naturels ou synthétiques. La fonction primaire de ces matrices est d'offrir un support adéquat pour une culture cellulaire, le plus souvent *in vitro*, afin de favoriser l'organisation des cellules en tissus ou organes. Le développement et la caractérisation des matrices 3D doivent être axés sur trois aspects principaux : leur morphologie, leur structure moléculaire et leur efficacité à être utilisées comme support pour cultures cellulaires.

Les propriétés des matrices 3D nécessaires à la réussite d'une culture cellulaire viable permettant une organisation en tissu ou organe dépendent de plusieurs facteurs. La nature du polymère utilisé doit être biocompatible et, dans le cas idéal, le polymère doit se résorber ou se dégrader avec une cinétique équivalente à celle de formation du tissu. La microstructure de la matrice 3D doit être poreuse et posséder un réseau interconnecté afin de permettre une pénétration, une migration et une distribution adéquate des cellules cultivées. De plus, ce type de structure doit offrir suffisamment d'espace pour assurer la croissance et l'organisation des cellules, tout en favorisant le transport des déchets et nutriments dans le système, assurant

ainsi la viabilité cellulaire. Les propriétés mécaniques des matrices doivent être adéquates pour soutenir la culture de cellules, et doivent habituellement rencontrer celles du tissu visé par l'application finale.

La structure moléculaire des polymères peut avoir plusieurs effets sur les propriétés des biomatériaux de type matrices 3D. Elle peut être en lien avec les propriétés mécaniques résultantes dans les matériaux générés, le type de morphologie obtenue et la biodurabilité (cinétique de résorption ou de dégradation). Il est donc d'une importance capitale de caractériser les matrices 3D au niveau morphologique, mécanique et moléculaire, afin de comprendre les interactions biomatériaux-cellules possibles lors de leur utilisation.

La première étape pour évaluer la fonctionnalité des matrices 3D destinées à l'ingénierie tissulaire est habituellement d'étudier le comportement des cellulesensemencées à l'intérieur ou sur ces dernières. Par comportement des cellules, on entend leur pénétration, migration, adhésion, prolifération, différenciation et viabilité. Si ces facteurs sont favorables pour le type cellulaire utilisé et l'application finale visée, des tests d'implantation *in vivo* peuvent habituellement être poursuivis.

Il devient évident que l'élaboration de biomatériaux pour une utilisation en ingénierie tissulaire est un domaine multidisciplinaire, requérant des connaissances tant en chimie des matériaux qu'en biochimie, physique, biologie cellulaire et moléculaire, etc. Cependant, bien que la compréhension des interactions entre les biomatériaux et un système biologique soit de plus en plus avancée, la matrice 3D idéale n'a toujours pas été conçue. Il en découle alors l'importance de raffiner les techniques de production de matrices 3D destinées à l'ingénierie tissulaire. Ceci est possible en utilisant des matières premières adéquates de par leur biocompatibilité et biodurabilité, et des procédés de production permettant de modifier la morphologie afin de l'adapter à l'application finale visée.

Le projet de recherche présenté dans ce mémoire visait la préparation de matrices 3D à base de fibroïne de soie suivi de leur caractérisation tant au niveau moléculaire que morphologique. Plus spécifiquement, le but était de comprendre les mécanismes moléculaires

responsables du changement des propriétés physiques des matériaux. De plus, le projet avait comme objectif d'évaluer la fonctionnalité de ces matrices en tant que support 3D pour effectuer la culture de cellules souches de carcinome embryonnaire de souris (P19).

Les fibres de cocons de ver à soie sont utilisées depuis des décennies en tant que biomatériaux pour effectuer des sutures de plaies ouvertes. Les avancées dans la compréhension de la composition et de la structure moléculaire de ces fibres ont mené au développement de techniques permettant de solubiliser ces protéines pour ensuite générer des matériaux. La structure moléculaire particulière de la fibroïne de soie, une protéine fibreuse peu ou pas immunogène présente dans les fils formant les cocons, conduit à des propriétés mécaniques exceptionnelles. La production de matériaux à partir de solutions de fibroïne de soie vise à modifier l'aspect morphologique final, tout en restituant la structure moléculaire des fibres natives.

Durant la dernière décennie, les méthodes visant la production de matrices 3D à base de fibroïne de soie se sont grandement étendues. Différentes morphologies peuvent être obtenues en fonction des méthodes de préparation, mais aussi une variété de méthodes pour induire une structure moléculaire similaire à celle de la fibre de soie native ont été développées. Dans le projet de recherche présenté, la méthode employée pour la production des matrices 3D est la congélation-lyophilisation. Cette méthode offre une versatilité de modifications morphologiques en variant des paramètres critiques à la séparation de phase liquide-solide lors de la congélation.

En effet, le processus de congélation-lyophilisation permet d'obtenir des matrices 3D poreuses dont la morphologie varie en fonction de la forme et de la taille des cristaux de solvants formés lors de la congélation. Afin de modifier ces paramètres, il est possible de varier la concentration en fibroïne dans les solutions, la vitesse de congélation, la température finale de congélation, ou d'incorporer des impuretés dans le système afin de perturber l'équilibre thermodynamique de la transition de phase liquide-solide. Les paramètres ayant été étudiés dans le présent projet sont la vitesse de congélation et l'ajout de chlorure de sodium (NaCl) dans les solutions de fibroïne avant la congélation. Les effets sur la

morphologie finale, les propriétés mécaniques et la structure moléculaire résultante ont été étudiés par MEB, tests mécaniques en compression, spectroscopie FTIR et XRD.

Finalement, la pénétration, l'organisation et la viabilité des cellules P19 incorporées dans les matrices 3D de fibroïne préparées ont été étudiées qualitativement en marquant les cellules à l'aide de fluorophores et en examinant les systèmes biomatériaux-cellules par microscopie confocale à balayage laser. Les P19 étant des cellules pluripotentes, elles peuvent se différencier en divers types cellulaires lors de leur développement. Le choix de ces cellules comme modèle pour valider la fonctionnalité des biomatériaux est lié à la simplicité relative de les faire croître, la quantité illimitée de matériel pouvant être obtenu et la possibilité de les différencier lorsque cultivées à haute densité puis exposées à des concentrations non-toxiques de certaines espèces chimiques bioactives.

Dans le Chapitre I, les notions théoriques de base sur les biomatériaux, l'ingénierie tissulaire et les protéines fibreuses, plus particulièrement la fibroïne de soie, sont exposées. Au Chapitre II, les aspects théoriques des méthodes utilisées pour préparer, caractériser et évaluer la fonctionnalité des biomatériaux préparés dans ce projet de recherche sont présentés. Le Chapitre III constitue un article scientifique soumis pour publication dans une revue scientifique. Le Chapitre IV présente un autre projet de recherche effectué durant mes études graduées dont le fond consiste en la valorisation de protéines, mais avec une finalité différente de celle du cadre principal du mémoire. De ce fait, cette section comporte une brève introduction pour la mise en contexte, les méthodes utilisées, les résultats et leur discussion ainsi que les conclusions générales qui en sont ressorties. Ce sujet porte sur la préparation et la caractérisation d'un excipient pharmaceutique à base d'un isolat de protéines de soja en combinaison avec de l'amidon riche en amylose. Finalement, le dernier chapitre rappelle les conclusions tirées de l'étude effectuée sur les matrices 3D à base de fibroïne ainsi que sur le projet portant sur l'utilisation d'amidon riche amylose combiné à des protéines de soja comme excipient pour effectuer de la libération contrôlée de traceur, et propose quelques perspectives futures.

Même si chronologiquement les travaux de maîtrise ont commencé avec des travaux sur des protéines de soja dans le cadre d'un projet CRSNG-Santé (collaboration Dr. Subirade de l'Université Laval et notre laboratoire à l'UQÀM), les travaux sur la fibroïne de soie ont permis d'acquérir des résultats suffisant à l'élaboration d'un article et ainsi représentent la majeure partie du mémoire. Cependant, les travaux sur les protéines de soja pourront ultérieurement mener vers une publication.

CHAPITRE I

CONTEXTE THÉORIQUE

1.1 Les biomatériaux

1.1.1 Définition et généralités

La définition de biomatériaux réfère à des matériaux tant naturels que synthétiques utilisés en contact avec un système biologique (Ratner *et al.*, 2004). Le préfixe *bio* ne fait donc pas référence à la nature des matériaux compris dans cette classe, mais bien aux applications auxquelles ils sont destinés. Par exemple, un biomatériau peut être applicable tant en médecine, lorsqu'utilisé sous forme de matériaux implantables, qu'en biologie ou biochimie lorsqu'utilisé en tant que support pour culture cellulaire *in-vitro* (Ratner *et al.*, 2004). La composition et les apparences des biomatériaux varient en fonction des besoins de l'application pour laquelle ils sont prescrits. Dans le domaine biomédical, les classes les plus répandues sont les polymères naturels ou synthétiques, les céramiques, les alliages de métaux, les composites, ou un agencement de plusieurs matériaux (Batich et Leamy, 2003; Ratner *et al.*, 2004). Le Tableau 1.1 liste la nature de divers biomatériaux en relation avec leur application dans le domaine biomédical.

Tableau 1.1 Applications et nature de biomatériaux utilisés dans le domaine biomédical (tiré de Ratner *et al.*, 2004)

Application	Types ou nature de matériaux
Système squelettique	
Remplacement d'articulations	Titane, alliage de Ti-Al-V , acier inoxydable, polyéthylène
Tiges de fixation de fractures osseuses	Acier inoxydable, alliage cobalt-chrome
Ciment pour les os	Poly(méthyl méthacrylate)
Réparation de défauts dans les os (fissures ou fractures)	Hydroxyapatite
Tendon et ligament artificiel	Teflon, Dacron
Implants dentaires	Titane, alliage de Ti-Al-V , acier inoxydable, polyéthylène, alumine, phosphate de calcium
Système cardiovasculaire	
Prothèses de vaisseaux sanguins	Dacron, Teflon, polyuréthane
Valve cardiaque	Tissus biologiques (greffes), acier inoxydable, carbone
Cathéter	Caoutchouc de silicone, Teflon, polyuréthane
Organes	
Cœur artificiel	Polyuréthane
Membranes pour réparation de la peau	Composites de silicone-collagène
Rein artificiel (hémodialyseur)	Cellulose, polyacrylonitrile
Sens	
Implants cochléaires	Électrodes de platine
Lentilles intra-oculaires	Poly(méthyl méthacrylate), caoutchouc de silicone, hydrogels
Lentilles cornéennes	Silicone-acrylate, hydrogels
Bandage cornéen	Collagène, hydrogels

La mise en œuvre des biomatériaux doit tenir compte de la nature chimique des matières premières, de l'aspect morphologique et des propriétés mécaniques requises, des conditions du milieu biologique et des interactions possibles entre ce dernier et les matériaux (Hoerstrup *et al.*, 2004). Tous ces aspects varient en fonction de l'application visée. La section suivante introduit quelques concepts de base dans la préparation des biomatériaux.

1.1.2 Concepts importants dans la science des biomatériaux

1.1.2.1 Un besoin à combler et un rôle à tenir

Les premiers biomatériaux étaient conçus pour le domaine biomédical afin de remplacer une fonction spécifique, le plus souvent mécanique, et étaient considérés idéaux s'ils provoquaient peu ou pas de réponses indésirables, telles des inflammations ou des réactions allergiques, dans les systèmes biologiques (Park, 1984). Les matériaux étaient constitués de substances inertes comme le Teflon dans le cas d'implants vasculaires, ou de métaux non oxydables dans le cas de réparations de fractures osseuses. Les propriétés mécaniques et la biocompatibilité des matériaux satisfaisaient les besoins mais certains problèmes subsistaient, tels des thromboses dans le cas des implants vasculaires ou des affaiblissements des os dans le cas des implants orthopédiques (Park, 1984).

De nos jours, les avancées dans la compréhension des systèmes biologiques au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire permettent de développer des biomatériaux de plus en plus sophistiqués. Les biomatériaux aspirent maintenant à remplacer complètement des tissus ou organes, ou à favoriser leur régénération en mimant la structure d'un milieu biologique (Hoerstrup *et al.*, 2004). Il est primordial de tenir compte des propriétés mécaniques du tissu ou de l'organe devant être remplacé ou amélioré à l'aide d'un biomatériau (Hoerstrup *et al.*, 2004; Ratner *et al.*, 2004). Aussi faut-il connaître les interactions possibles entre ce dernier et le système biologique afin d'obtenir un bon résultat. La nature et la morphologie des matériaux influencent grandement ces interactions (Hoerstrup *et al.*, 2004). Par exemple, pour la reconstruction osseuse, des matériaux poreux avec des propriétés mécaniques semblables à celles des os peuvent être développés afin de mimer la structure des tissus osseux tout en favorisant la migration cellulaire vers l'intérieur des implants (Ren *et al.*, 2002). Afin de remplir leurs rôles, en plus de disposer d'une composition, d'une structure et de propriétés mécaniques adéquates, les biomatériaux doivent être biocompatibles et être pourvus d'une biodurabilité adaptée aux applications visées.

1.1.2.2 Biocompatibilité

La biocompatibilité d'un biomatériau est sa capacité à remplir son rôle au niveau du système biologique dans lequel il est appliqué, tout en ne produisant peu ou pas de réactions indésirables (Ratner *et al.*, 2004). Ce critère relève donc de la réponse de l'organisme en présence des biomatériaux. Les réactions indésirables possibles peuvent être d'origines et de natures diverses telles des réactions inflammatoires et/ou immunologiques, des intoxications suite à une dégradation des matériaux, la promotion de cellules cancéreuses, la nécrose des cellules, etc. (Anderson *et al.*, 2004; Hoerstrup *et al.*, 2004). La biocompatibilité des biomatériaux est reliée à leur nature et à la capacité du système biologique à accepter ou rejeter ce matériau.

1.1.2.3 Biodurabilité

Inversement à la biocompatibilité, la biodurabilité d'un biomatériau rend compte de la réponse du matériau face à l'action de l'environnement biologique dans le système étudié (Curtis et Colas, 2004). Ce critère dépend de la nature chimique des matériaux mais aussi des contraintes chimiques et physiques imposées par l'environnement biologique en contact avec lui (Coury *et al.*, 2004). Le biomatériau peut être modifié ou dégradé par un stress mécanique causé par la charge exercée au lieu d'implantation (Hoerstrup *et al.*, 2004), ou par l'infiltration et la croissance des cellules à l'intérieur ou à la surface de ce dernier (Liu *et al.*, 2008). Il peut aussi être affecté par le pH du système biologique, la présence d'enzymes, la température du système, etc. (Coury *et al.*, 2004). Les effets possibles sont multiples et varient en fonction de la nature du biomatériau, de sa structure et de l'environnement biologique dans lequel il est appliqué (Coury *et al.*, 2004; Hoerstrup *et al.*, 2004). Par exemple, des matériaux à base de protéines, comme le collagène ou la fibroïne, peuvent se biodégrader sous l'action d'enzymes (Altman *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006).

1.1.2.4 Bioinerte ou bioactif

Un matériau bioinerte n'est pas toxique lorsqu'il est implanté dans un système *in-vivo* et ne se décompose pas, ou peu, avec le temps. Les matériaux bioinertes sont surtout utilisés pour remplacer des fonctions mécaniques, comme dans le cas des céramiques utilisées en médecine et dentisterie (Kohn, 2003). Un avantage recherché chez les biomatériaux est la bioactivité, soit la capacité du matériau à interagir avec le milieu biologique. Afin de satisfaire ce critère, certains biomatériaux peuvent contenir des facteurs de croissance ou autres molécules thérapeutiques et offrir une libération contrôlée, favorisant ainsi la régénération des tissus ou empêchant les infections ou réactions inflammatoires au site d'implantation (Hoerstrup *et al.*, 2004; Uebersax, Merkle et Meinel, 2008). D'autre part, certains matériaux polymériques peuvent posséder des sites de reconnaissance cellulaire greffés à leurs chaînes, favorisant ainsi l'adhérence, la croissance et la différenciation de cellules dans le biomatériau. Par exemple, des matériaux 3D d'hydroxyapatite sur lesquels des séquences peptidiques RGD (Arg-Gly-Asp) ont été greffées ont démontré leur capacité à favoriser l'adhésion de cellules ostéoprogénitrices (Durrieu *et al.*, 2004).

La nécessité croissante de mieux comprendre les interactions biomatériaux-tissus pour subvenir aux besoins du domaine biomédical a rapidement évolué vers le développement et l'avancée d'un secteur de recherche nommé l'ingénierie tissulaire.

1.2 L'ingénierie tissulaire

1.2.1 Définition et généralités

L'ingénierie tissulaire est un secteur d'activité se situant à l'interface du domaine biomédical et des sciences de l'ingénierie. Elle vise le développement de substituts biologiques afin de restaurer ou maintenir l'intégrité et les fonctions de tissus biologiques (Hoerstrup *et al.*, 2004). Ce champ de recherche est multidisciplinaire, nécessitant des connaissances et procédés propres à plusieurs domaines tels la chimie, la biochimie, la biologie cellulaire, la biologie moléculaire, la physique, les sciences des matériaux, etc.

Un des principes couramment utilisé dans l'ingénierie tissulaire consiste à ensemencer un support à culture cellulaire 3D, la matrice, avec les cellules désirées (Hoerstrup *et al.*, 2004). Dans les conditions adéquates, les cellules vont croître, s'organiser et produire leur propre matrice extra-cellulaire pour former un tissu *in vitro*. Le système résultant est ensuite étudié afin d'élucider les interactions biomatériaux-cellules lors du processus de la formation du tissu *in vitro*. Le tissu ou l'organe peut finalement être implanté à sa localisation appropriée dans un système biologique. La Figure 1.1 illustre les principes de base de cette méthode.

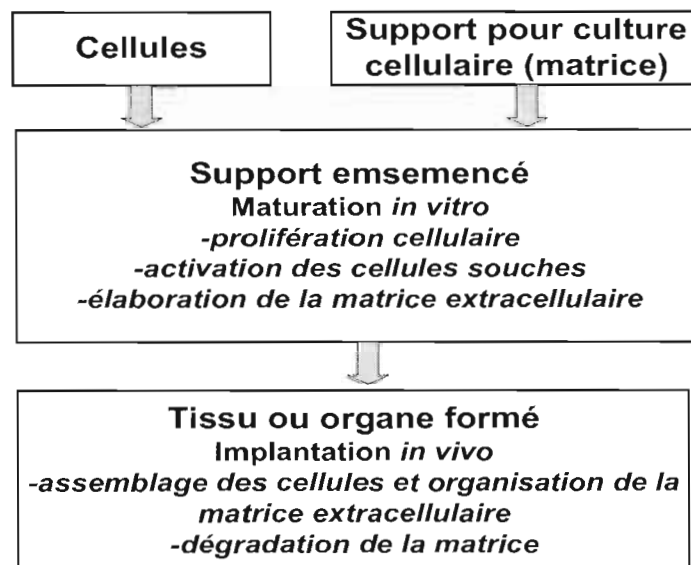


Figure 1.1 Paradigme principal utilisé en ingénierie tissulaire. (Adapté de Hoerstrup *et al.*, 2004)

Les composantes de base de l'ingénierie tissulaire sont donc les cellules cultivées ainsi que la matrice utilisée pour effectuer la culture. L'origine des cellules employées en ingénierie tissulaire peut être variée. Elles peuvent être autologues, allogéniques ou xénogéniques, différenciées ou cellules souches (Hoerstrup *et al.*, 2004). Pour sa part, la matrice est utilisée comme substrat pour favoriser la croissance et l'organisation des cellules

en agissant d'abord comme support physique. Les caractéristiques des matrices sont variables et seront discutées dans la section suivante.

1.2.2 Les matrices et l'ingénierie tissulaire

1.2.2.1 Le design et la morphologie

Le design et la morphologie des matrices sont des facteurs modifiables cruciaux en ingénierie tissulaire. Ils doivent être adaptés aux besoins des cellules en matière d'adhérence, de croissance, d'organisation et de viabilité durant la culture. Typiquement, pour satisfaire à ces conditions, les matrices sont constituées d'un réseau poreux interconnecté. Ce design permet aux cellules de pénétrer et de migrer dans la matrice librement, tout en assurant leur croissance, leur maturation, et leur viabilité en favorisant l'apport en nutriments nécessaires et l'évacuation des déchets (Berthiaume et Yarmush, 2003; Hoerstrup *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Stratégies de préparation de matrices tridimensionnelles

Les méthodes de préparation des matrices sont diverses et varient en fonction du tissu ou de l'organe visé pour une reconstruction. Différentes méthodes sont décrites et illustrées ci-dessous.

L'induction de tissu (Figure 1.2) : Dans cette méthode, le tissu présent au site d'implantation croît vers l'intérieur d'une matrice agissant en tant que support pour le type cellulaire désiré. La matrice implantée devient progressivement vascularisée et colonisée par le tissu environnant. Cette méthode peut être améliorée en incorporant des molécules bioactives dans la matrice (Hoerstrup *et al.*, 2004).

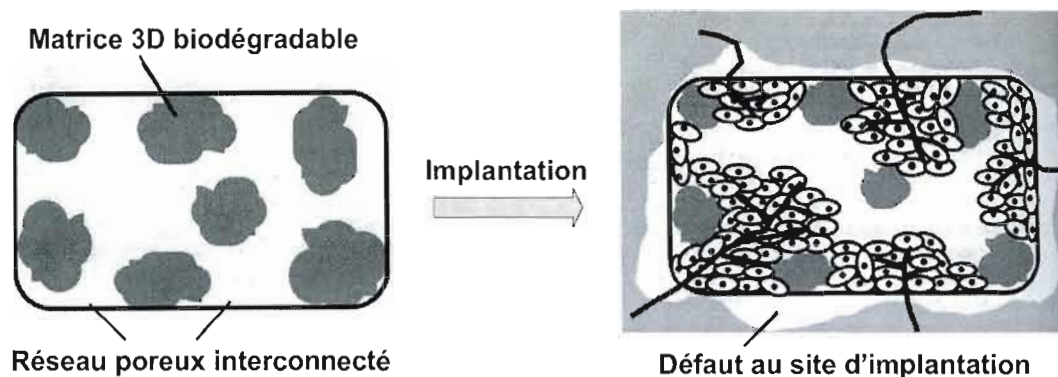


Figure 1.2 Schéma d'une matrice 3D utilisée pour induire l'infiltration des cellules et la formation de tissu après son implantation. (Tiré de Hoerstrup *et al.*, 2004)

La pré-vascularisation (Figure 1.3): Cette technique est utilisée dans le cas d'implants 3D de large taille pour assurer l'apport en nutriments essentiels à la survie cellulaire au centre du biomatériau implanté. Ce procédé consiste à permettre la vascularisation *in vivo* du biomatériau au site d'implantation désiré avant d'y ensemençer les cellules voulues par injection (Hoerstrup *et al.*, 2004).

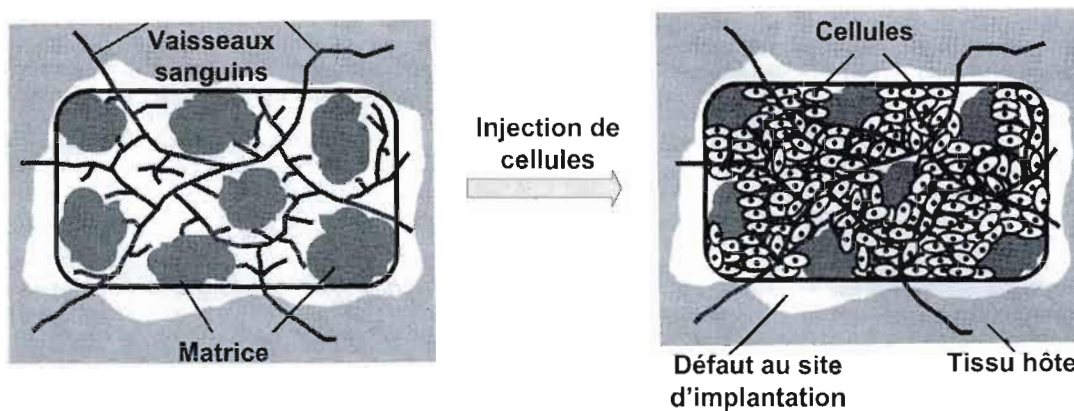


Figure 1.3 Schéma d'une matrice 3D pré-vascularisée *in vivo* avant l'injection de cellules. (Tiré de Hoerstrup *et al.*, 2004)

La polymérisation *in situ* (Figure 1.4) : Certains polymères biorésorbables ou biodégradables peuvent être injectés directement au site désiré afin de combler des défauts de différentes formes et tailles. Ce type de technique nécessite des réactifs qui produiront une matrice poreuse avec un réseau interconnecté lorsque soumis aux conditions physiologiques. Puisque les réactions de polymérisation et/ou de réticulation se produisent *in vivo*, tous les produits utilisés doivent être biocompatibles. Aussi, les conditions de réaction telles que la température, le pH et la libération d'énergie ne doivent pas endommager les cellules implantées ou les tissus environnants (Hoerstrup *et al.*, 2004).

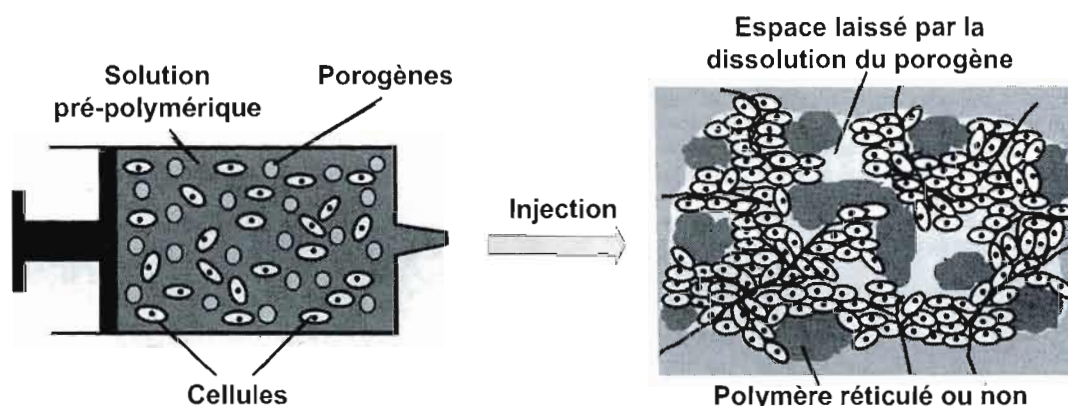


Figure 1.4 Schéma de formation de matrice 3D par injection d'une solution polymérisable en milieu physiologique. (Tiré de Hoerstrup *et al.*, 2004)

La transplantation cellulaire (Figure 1.5) : Cette procédure est la plus courante et consiste à cultiver les cellules désirées dans une matrice *in vitro* avant d'effectuer une transplantation au site désiré. La durée de la culture cellulaire varie avec le type cellulaire cultivé et le type d'application visée. Habituellement, les cellules doivent avoir adhéré à la matrice, proliféré et s'être différenciées avant l'implantation (Hoerstrup *et al.*, 2004).

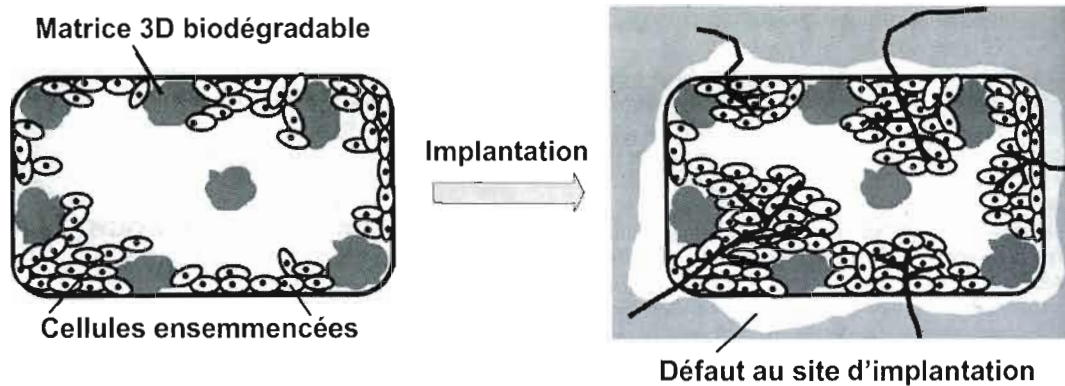


Figure 1.5 Schéma d'une matrice 3D ensemencée de cellules avant l'implantation dans le système physiologique. (Tiré de Hoerstrup *et al.*, 2004)

Les méthodes de préparation des matrices 3D vont varier avec la nature chimique du biomatériau utilisé et de l'application finale. Les techniques les plus courantes pour produire des biomatériaux poreux sont la séparation de phase, la production de fibres liées ou enchevêtrées, la lyophilisation, l'intégration d'agents porogènes et leur solubilisation ultérieure, et l'utilisation de gaz comme porogène (Park, 1984; Hoerstrup *et al.*, 2004).

Pour remplir leur rôle, la nature des matières premières utilisée dans la conception des matrices 3D doit rencontrer certaines spécifications. Comme pour tous les biomatériaux, les matrices doivent être biocompatibles et posséder les propriétés mécaniques appropriées à leur utilisation, soit la culture cellulaire et la formation de tissus ou d'organes dans le cas de l'ingénierie tissulaire. En plus, la matrice idéale devrait se résorber ou se biodégrader avec une cinétique équivalente à celle de la formation du tissu ou de l'organe (Hoerstrup *et al.*, 2004). Les espèces libérées durant la dégradation de la matrice ne doivent pas nuire aux cellules et, au mieux, favoriseront leur croissance. Les avancées dans les sciences des matériaux ont procuré une multitude de polymères synthétiques rencontrant certaines de ces spécifications, mais rarement toutes à la fois (Park, 1984; Yannas, 2004). Les polymères biologiques ou des macromolécules sont une avenue de choix qui sera élaborée à la section suivante.

1.3 Les biomacromolécules pour la production de biomatériaux

1.3.1 Avantages et inconvénients

De par leur nature biologique, les biopolymères ou biomacromolécules sont souvent similaires aux espèces qu'un environnement biologique peut reconnaître et gérer métaboliquement (Yannas, 2004). Ils offrent donc le potentiel d'être biocompatibles et biodégradables dans la majorité des cas. Cependant, la nature biologique de ces matériaux peut entraîner des réactions immunogènes, menant à des complications et/ou des risques de rejet (Yannas, 2004). De plus, leur utilisation exige habituellement la transformation d'une matière première pour en extraire le biopolymère ou les biomacromolécules. Ce processus d'extraction et de purification doit être bien contrôlé pour maintenir l'intégrité des molécules biologiques afin de pouvoir ultérieurement les régénérer en matériaux fonctionnels.

1.3.2 Les protéines fibreuses

Les protéines fibreuses, en raison de leurs propriétés d'assemblage particulières, sont une classe de biomacromolécules intéressantes pour la production de biomatériaux. La nature répétitive de leur séquence primaire d'acides aminés conduit à la formation de structures secondaires relativement homogènes (Wang *et al.*, 2006). Cette organisation a des répercussions significatives sur les propriétés macroscopiques et fonctionnelles de ces protéines (Kaplan, 1998). Elles possèdent un pouvoir d'auto-assemblage, et lorsqu'assemblées en fibres, disposent de propriétés mécaniques exceptionnelles (Kaplan, 1998). Les protéines fibreuses sont pratiquement insolubles dans l'eau. Elles comprennent entre autre le collagène, l'élastine, la kératine alpha, la spidroïne (protéine de soie d'araignées) et la fibroïne (protéine de soie de ver à soie). L'agencement des acides aminés et les structures moléculaires résultantes dominantes sont listées dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2 Liste de différentes protéines fibreuses, de leurs motifs d'acides aminés les plus récurrents, de la structure secondaire résultante, et de leur présence dans la nature
(Adapté de Arnold et Marcotte, 2009)

Protéines fibreuses	Motif général de répétition	Structure secondaire	Présence
Collagènes	Gly-X-Y avec les acides aminés X et Y variant, proline et hydroxyproline étant les plus fréquents	triple hélice de collagène	tendons, os, peau, organes internes
Élastine	Val-Pro-Gly-Val-Gly	chaînes de polymères réticulés, aucune structure secondaire dominante	vaisseaux sanguins, derme
Kératine α	Ala-Glu-Gln-Phe-Arg-Asp-Gln	majorité hélices α	ongles, griffes, poils, cheveux
Fibroïne de soie	Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser	feuillets β en majorité, présence d'hélices α	cocons protecteur du ver à soie
Spidroïne de soie	(Ala) _n , Gly-Gly-X, Gly-Pro-Gly-Gly-X/Gly-Pro-Gly-Gln-Gln avec X étant un acide aminé variable	feuillets β riches en Ala et hélices 3 ₁ riches en Gly	soies d'araignées

L'utilisation de protéines fibreuses dans la conception de biomatériaux nécessite un contrôle rigoureux des méthodes d'extraction et de purification. De plus, les matériaux doivent pouvoir être stérilisés suite à leur confection, ou être préparés en milieu stérile. Cet aspect représente un défi de taille avec les systèmes protéiques qui peuvent se dégrader, se dénaturer et/ou changer de conformation sous l'action de la chaleur ou de certains solvants (Yannas, 2004). La fibroïne de soie du ver à soie *Bombyx mori* a été grandement étudiée au courant des dernières décennies pour ses propriétés mécaniques intéressantes, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité.

1.3.3 La fibroïne du ver à soie *Bombyx mori* dans la préparation de biomatériaux

1.3.3.1 La fibroïne de soie séricicole

La fibre de soie formant le cocon protecteur du ver à soie *Bombyx mori* est formée de deux types de protéines majeures, la fibroïne et la sérécine. Les sérécines sont des protéines gommeuses de masses molaires variant entre 20 et 310 KDa (Vepari et Kaplan, 2007). Elles enrobent et lient deux fibrilles de fibroïne d'environ 10-25 μm de diamètre (Vepari et Kaplan, 2007), tel qu'illustré à la Figure 1.6 b (Shao et Vollrath, 2002). Les sérécines sont reconnues pour leur caractère immunogène et sont donc indésirables dans la production de biomatériaux (Altman *et al.*, 2002). De son côté, la fibroïne est constituée de deux sous-unités d'environ 26 et 390 KDa reliées par un pont disulfure (Perasso *et al.*, 2000; Vepari et Kaplan, 2007). Les résidus Gly, Ala, Ser et Tyr comptent pour environ 90% de la composition totale en acides aminés (Sashina *et al.*, 2006). La structure secondaire est majoritairement organisée en feuillets β antiparallèles empilés et stabilisés par les interactions hydrophobes entre les chaînes latérales de l'alanine et de la glycine (Figure 1.6c) (Voet et Voet, 1998).

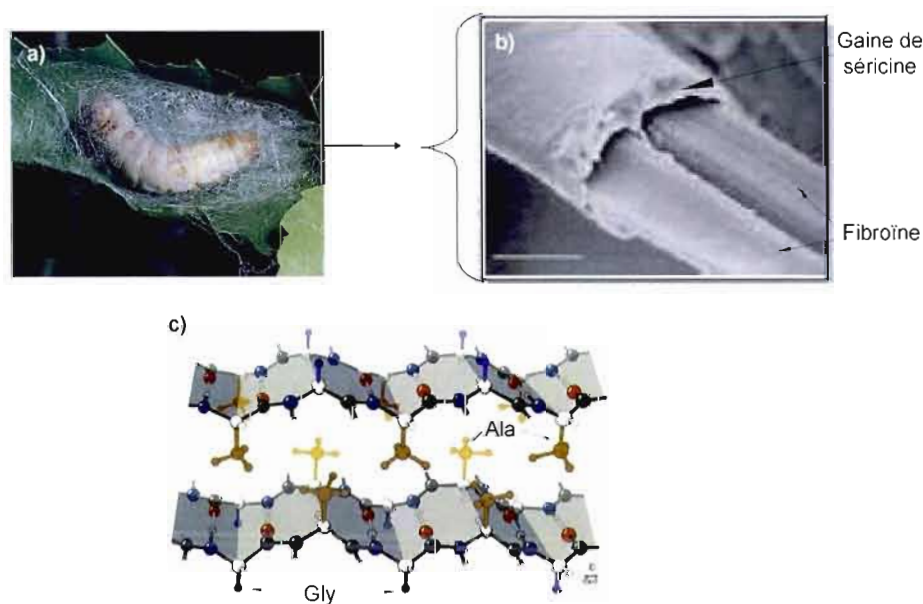


Figure 1.6 a) Photographie d'un ver à soie *Bombyx mori* tissant son cocon protecteur, b) Image d'une fibre de soie captée par MEB (Shao et Vollrath, 2002) et c) Agencement en feuillets β de la fibroïne. (Tiré de Voet et Voet, 1998)

La Figure 1.7 illustre le processus d'assemblage et de formation des fibres de soie. La soie est composée majoritairement de séquences d'acides aminés à chaînes latérales hydrophobes reliées entre elles par de petites séquences d'acides aminés hydrophiles agissant comme séparateurs (Jin et Kaplan, 2003). Les segments terminaux, plus volumineux que les séparateurs, sont aussi hydrophiles. Cette séquence peptidique permet un auto-assemblage des segments hydrophobes pour former les zones cristallines riches en feuillets β (Braun et Viney, 2003). Ce processus de transformation de la soie liquide en fibres solides s'effectue à partir de glandes spécialisées dans les vers à soie. La formation des fibres inclurait un passage par des états de gels globulaires composés de regroupement de micelles (Braun et Viney, 2003; Jin et Kaplan, 2003). Ces micelles mèneraient à la formation d'une phase liquide cristalline lors d'une augmentation de la concentration en protéines (Wang *et al.*, 2006). Durant la production de la fibre par le ver, une étape finale de déshydratation serait combinée à un stress mécanique causé par la compression de la phase sol-gel à travers l'orifice d'évacuation de la glande (Jin et Kaplan, 2003).

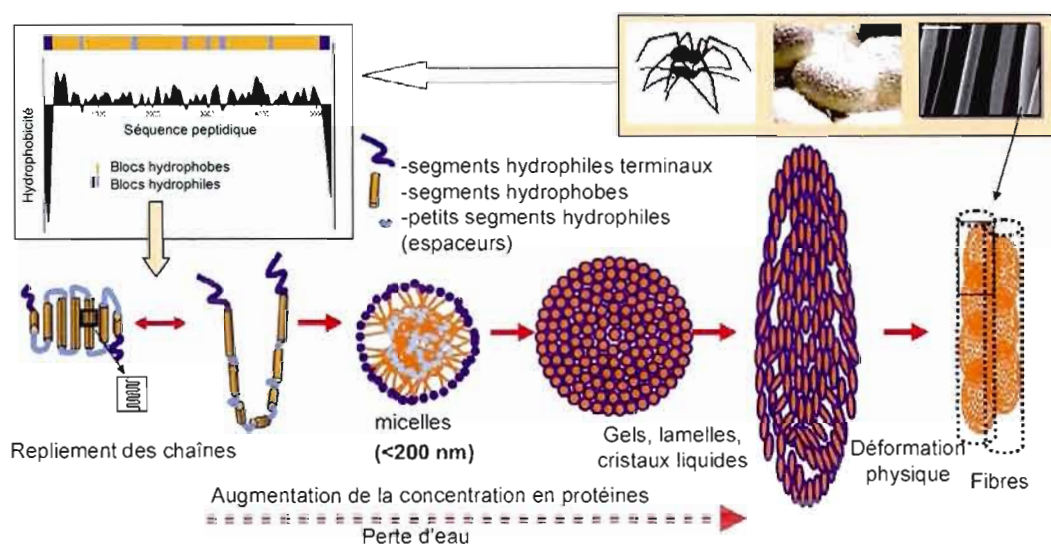


Figure 1.7 Représentation schématique du processus d'assemblage et de formation des fibres de soie. (Adaptée de Wang *et al.*, 2006)

L'auto-assemblage des zones hydrophobes en feuillets β empilés est responsable de l'insolubilité de ces fibres dans l'eau. Il est aussi responsable des propriétés mécaniques exceptionnelles de ces fibres. Elles sont résistantes à l'élongation et la compression tout en étant extensibles et résilientes (Altman *et al.*, 2003). De plus, la quantité de cocons produits par la sériciculture chaque année est d'environ 400 000 tonnes, ce qui en fait une matière première abondante à un prix relativement faible. Enfin, pour ses propriétés mécaniques intéressantes, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité, la fibroïne de soie du ver à soie *Bombyx mori* est une matière première avantageuse pour la production de biomatériaux.

1.3.3.2 Mise en œuvre de matériaux à base de fibroïne de soie

Les fibres de soie ont été utilisées depuis des décennies en tant que biomatériau pour effectuer des sutures (Altman *et al.*, 2003; Vepari et Kaplan, 2007). Les avancées dans la compréhension de la structure moléculaire et du processus d'assemblage de la fibroïne ont permis de développer plusieurs méthodes de solubilisation et de génération de matériaux. Ces dernières sont optimisées afin de rompre la structure secondaire cristalline de la fibroïne tout en conservant l'intégrité de la structure primaire des chaînes peptidiques (Yamada *et al.*, 2001; Altman *et al.*, 2003). Le processus de solubilisation de la soie est décrit plus en profondeur à la section 2.1 de ce document. Une fois la fibroïne en solution, plusieurs types de matériaux peuvent être produits tel qu'illustré à la Figure 1.8.

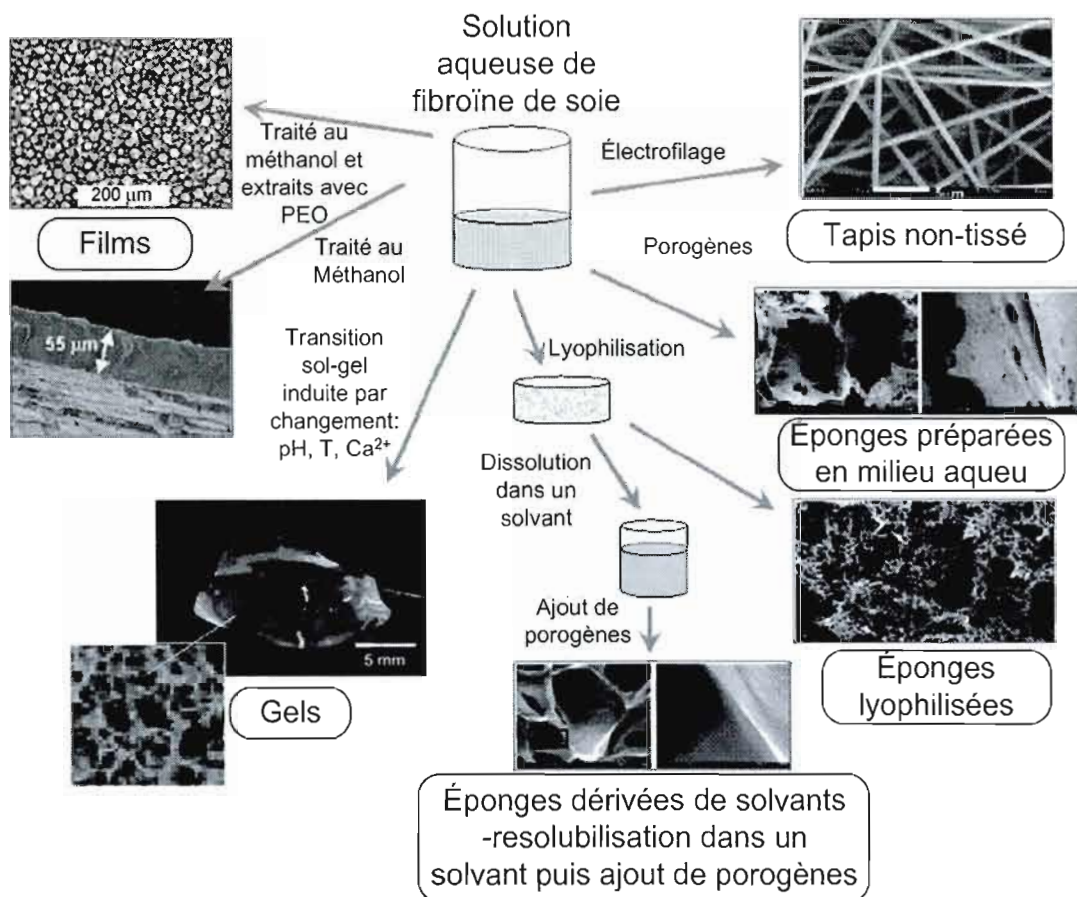


Figure 1.8 Méthodes principales utilisées et types de matériaux engendrés à partir de solutions aqueuses de fibroïne de soie. (Tirée de Vepari et Kaplan, 2007)

Bien que les méthodes de fabrication varient en fonction du type de matériau préparé, elles ont en commun la régénération de la fibroïne en forçant ou en favorisant son auto-assemblage. La base de ces méthodes consiste à induire des interactions entre les regroupements de micelles de protéines en solution (Figure 1.7) pour former des superstructures moléculaires (Wang *et al.*, 2006). Ces interactions sont favorisées soit en augmentant la concentration en protéines, ce qui est possible en retirant l'eau de solvation des regroupements de micelles, soit en utilisant des conditions favorables aux interactions entre les chaînes peptidiques (Sashina *et al.*, 2006). Ainsi, l'évaporation lente de l'eau permet un assemblage conduisant à des films (Lv *et al.*, 2005; Servoli *et al.*, 2005). Des hydrogels

formés de réseaux de fibroïne compact en solution sont produits en augmentant la température, en ajoutant des cations divalents tel le calcium ou en ajustant le pH au point isoélectrique de la fibroïne (pH $\sim$ 4,2) (Vepari et Kaplan, 2007). Enfin, des méthodes d'électrofilage permettent de générer des fibres seules ou associées à d'autres polymères comme l'oxyde de polyéthylène (Jin *et al.*, 2002). Il est aussi possible d'introduire d'autres molécules actives lors du processus d'électrofilage, dont le peptide de morphogénèse osseuse BMP-2, une protéine reconnue pour induire l'ostéogénèse chez les cellules souches (Li *et al.*, 2006).

La production d'éponges de fibroïne utilisables comme matrices 3D pour effectuer de la culture cellulaire a été grandement étudiée au courant de la dernière décennie. Les méthodes les plus courantes de formation de telles matrices sont la lyophilisation (Li *et al.*, 2001), l'utilisation de NaCl comme agent porogène (Kim *et al.*, 2005b), la production de gaz comme agent porogène (Nazarov, Jin et Kaplan, 2004) et les successions de congélation décongélation en présence de solvant (Tamada, 2005). La lyophilisation permet de modifier la morphologie finale des matrices. Ceci est possible en faisant varier entre autre la température de congélation, la vitesse de congélation, et la concentration initiale de fibroïne avant la congélation préalable à la lyophilisation (Mandal et Kundu, 2009). Cette technique offre une versatilité de modifications morphologiques grâce à la possibilité de contrôler la taille et la cinétique de formation des cristaux de glace lors du processus de congélation (Madhally et Matthew, 1999; Stokols et Tuszynski, 2004; Mandal et Kundu, 2009). De plus, les éponges préparées par lyophilisation peuvent être resolubilisées dans un solvant organique tel l'hexafluoro-isopropanol. Ensuite, en contrôlant la concentration des solutions de fibroïne, d'autres types d'éponges avec des caractéristiques morphologiques (porosité, taille des pores, densité des matériaux) variables en fonction des porogènes ajoutés à ces solutions peuvent être formées. Il est aussi possible de produire des éponges en milieu aqueux en utilisant du NaCl en conditions saturantes. Les caractéristiques morphologiques de ces éponges sont aussi adaptables grâce à l'utilisation de NaCl avec une taille de cristaux contrôlée. Ce processus de formation d'éponge est possible en créant une compétition entre l'eau de solvation des chaînes peptidiques et l'eau de solvation des ions de sel en solution. Puisque l'eau de solvation des protéines devient utilisée pour solvater les ions de sel dans la

solution, les interactions entre les groupements hydrophobes des acides aminés de la fibroïne sont favorisées et un hydrogel riche en feuillets β est alors formé autour des particules de NaCl (Kim *et al.*, 2005b).

Le processus de préparation de matériaux avec la fibroïne de soie inclut habituellement une étape supplémentaire afin de favoriser la formation de feuillets β dans la structure moléculaire, menant ainsi à son insolubilité tout en améliorant ses propriétés mécaniques. Les méthodes courantes pour induire la cristallinité dans la soie sont les traitements avec des alcools polaires tels le méthanol ou l'éthanol (Chen *et al.*, 2001), les traitements à faible pH (He, Valluzzi et Gido, 1999), l'utilisation de NaCl en conditions saturantes comme porogène (Kim *et al.*, 2005a) et les traitements à des températures élevées (Lv *et al.*, 2005). Si nécessaire, il est possible de stériliser les matrices à l'autoclave, ce qui diminue légèrement les propriétés mécaniques sans toutefois affecter leur utilisation en tant que biomatériaux (Tamada, 2005).

Plusieurs biomatériaux à base de fibroïne ont démontré leur fonctionnalité pour la culture cellulaire. Des cellules souches ont été cultivées et différenciées en tissus osseux et cartilages avec succès (Wang *et al.*, 2005; Marolt *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2007). De plus, une matrice 3D de fibroïneensemencée de cellules souches mésenchymateuses humaines différenciées en conditions ostéogéniques a démontré son efficacité pour accélérer la reconstruction d'un fémur de rat brisé (Meinel *et al.*, 2006).

1.4 Problématique, hypothèses de recherche et objectifs

La compréhension de plus en plus approfondie des relations entre la morphologie de matrices 3D et les besoins de cellulesensemencées (espace suffisant à la pénétration, la prolifération et l'organisation ainsi qu'au transport des déchets et nutriments) a mené vers le développement de méthodes originales afin d'adapter la macrostructure des biomatériaux. Il est connu que l'ajout de NaCl en conditions saturantes dans des solutions de fibroïne favorise la formation de feuillets β au sein de la structure moléculaire des matériaux résultants en plus de permettre de contrôler la porosité de ces derniers. Aussi, l'effet de la température de

congélation est reconnu pour avoir un impact marqué sur l'aspect physique final de matrices 3D lyophilisées. La morphologie et la structure moléculaire ayant une influence importante sur les propriétés finales de ces biomatériaux voués à la culture cellulaire, il est pertinent d'étudier ces variations afin de produire des matrices 3D efficaces dans leurs fonctions. Pour notre projet, il a été supposé qu'une modification de la température de congélation (et donc de la cinétique de congélation), combinée à la présence de sel dilué en solution, affecterait la morphologie finale et la structure moléculaire de matrices 3D de fibroïne lyophilisées.

Ainsi, l'objectif général du projet de recherche était de préparer, par processus de congélation-lyophilisation, des matrices 3D à base de fibroïne de soie utilisables comme support pour culture cellulaire. Plus spécifiquement, nous avons étudié l'effet de la modification simultanée de l'ajout de sel (en solutions diluées et en concentrations variables) et de la température de congélation (préalable à la lyophilisation) de solutions de fibroïne par rapport à la morphologie finale des matrices 3D résultantes. L'impact de ces paramètres sur la structure moléculaire secondaire des matériaux a été sondé avant et après un traitement au méthanol (processus induisant leur insolubilité). La morphologie des matériaux a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB) et les variations de la structure moléculaire ont été suivies par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec réflexion totale atténuée (FTIR-ATR) et diffraction des rayons X (XRD). Les propriétés mécaniques des matrices hydratées ont aussi été évaluées pour déterminer les effets de l'ajout de sel et du changement de la température de congélation sur la capacité des matrices à supporter la culture de cellules.

L'objectif final étant d'obtenir des matrices 3D avec des morphologies optimisées pour la culture de cellules, i.e. permettant leur pénétration, croissance, migration, organisation et viabilité, des cellules souches de carcinome embryonnaire (P19) ont été injectées dans les matériaux. La pénétration et l'organisation des cellules marquées à l'ester de *N*-succinimidyl 5(6)-Carboxyfluorescéine diacétate (CFSE) ont été suivies par microscopie confocale à balayage laser. Parallèlement, la viabilité des P19 a été observée qualitativement par la même technique en incubant avec de l'iodure de propidium (PI) les matricesensemencées. Le prochain chapitre (II) élabore les méthodes et techniques de préparation et de caractérisation

utilisées dans le projet de recherche présenté. L'ensemble des travaux portant sur les matrices 3D de fibroïne et leur utilisation comme support pour la culture cellulaire est présenté sous forme d'article au Chapitre III.

Un autre objectif des travaux de maîtrise a été d'étudier l'association des protéines de soja et de l'amidon riche en amylose gélatinisé comme co-excipients pour la libération de médicaments (Chapitre IV). L'hypothèse de ce projet était fondée sur le fait que les protéines présentent des propriétés tampon et que, associées comme excipients dans des formulations pharmaceutiques ou nutraceutiques, elles pourraient assurer la stabilité des agents actifs (médicaments, facteurs de croissances, pro-biotiques) face aux agents dénaturants (variation de pH, enzymes). Pour des formulations à administration orale, elles pourraient ainsi protéger les actifs lors du passage dans le milieu acide de l'environnement gastrique.

De son côté, l'amylose (l'amidon riche en amylose) peut, en certaines conditions, stabiliser les formes pharmaceutiques par des interactions entre les chaînes polymériques, suite à une organisation favorable de la matrice. Cette organisation (assemblage stabilisé par ponts hydrogène) peut moduler l'accès de l'eau dans la matrice et contrôler la libération de l'actif.

L'association des protéines de soja aux chaînes d'amidon pourrait donc générer un excipient avec des propriétés intéressantes, assurant la stabilité des actifs face à la dénaturation gastrique (par les propriétés tampon et stabilisantes des protéines), et leur libération contrôlée par la structure stabilisante de l'amidon riche en amylose.

Les objectifs spécifiques de ce projet étaient d'étudier différentes conditions de mélange de l'amidon riche en amylose et des protéines de soja puis d'évaluer si les méthodes employées génèrent une association strictement physique ou sous forme de réseau interconnecté entre les deux produits. Il fallait ensuite déterminer l'impact des méthodes de préparation utilisées par rapport aux propriétés de libération d'un traceur dans les milieux gastrique et intestinal simulé en présence et absence d'enzymes digestives.

Dans cette perspective, des mélanges entre l'amidon riche en amylose et les protéines de soja ont été effectués de façon mécanique ou par suspension en milieu aqueux suivi d'un

co-séchage par atomisation ou congélation-lyophilisation. Les structures résultantes ont été observées par MEB et certaines propriétés pouvant influencer le comportement des excipients ont été étudiées. Ainsi, la solubilité des protéines a été quantifiée par la méthode de Bradford, le contenu en eau adsorbée de façon réversible et irréversible a été quantifié par analyse thermogravimétrique (TGA), les propriétés d'écoulement des poudres ont été analysées par densité avant et après tassement et les duretés des différents comprimés monolithiques ont été mesurées. Enfin, des formulations avec la 8-hydroxyquinoline hemisulfate hemihydrate (HQN) comme traceur ont été réalisées et les cinétiques de libération en milieux gastrique et intestinal simulés ont été établies en présence et absence d'enzymes digestives.

CHAPITRE II

ASPECTS THÉORIQUES DES MÉTHODES ET TECHNIQUES UTILISÉES DANS LE PROJET DE RECHERCHE

2.1 Méthode de purification et de solubilisation de la fibroïne de soie

Tel que mentionné au Chapitre I, la fibre de soie est recouverte d'une gaine de sérécine devant être retirée avant la solubilisation de la fibroïne. Cette étape s'effectue par des nettoyages successifs de cocons de soie dans une solution aqueuse légèrement basique et bouillante, suivis de rinçages avec de l'eau distillée chaude (Nazarov, Jin et Kaplan, 2004). Une fois les fibres nettoyées, elles sont séchées puis dissoutes dans une solution de bromure de lithium à 9,3M. La solubilisation des fibres de soie en milieu salin concentré est possible grâce aux interactions entre les ions solvatés et les groupements fonctionnels des macromolécules de fibroïne. Les liens hydrogènes intra et inter-moléculaires des chaînes de fibroïne sont rompus par l'attaque nucléophile des anions solvatés au niveau des groupements polaires et chargés tels les liens amides, le glutamate et l'aspartate par exemple (Sashina *et al.*, 2006). Pour accélérer la solubilisation, il est possible de chauffer les solutions. La température doit cependant rester inférieure à 70°C afin d'éviter la dégradation des chaînes de fibroïne (Yamada *et al.*, 2001). Suite à la solubilisation de la fibroïne, une étape de dialyse est nécessaire pour éliminer les sels et les fragments de fibroïne inférieurs à 3500 g/mol.

2.2 La confection de matrices 3D à base de fibroïne par lyophilisation

La congélation-lyophilisation est une approche versatile pour la formation de matrices poreuses 3D à base de fibroïne de soie (Vepari et Kaplan, 2007). La méthode consiste à créer une séparation de phase entre la fibroïne et l'eau dans le système lors de la congélation.

Durant le processus, il y a d'abord formation de cristaux de glace avec l'eau libre dans le système. La concentration en fibroïne augmente graduellement avec la formation de cristaux de glace et il y a assemblage des protéines pour former un réseau tridimensionnel interconnecté entre les cristaux (Li *et al.*, 2001). La sublimation de la glace lors de la lyophilisation laisse des espaces vides là où les cristaux étaient présents. Le processus conduit donc à une matrice 3D poreuse (Zhang et Cooper, 2007).

Les avancées dans la compréhension du processus de formation et de croissance des cristaux de glace lors de la congélation, tel qu'étudié dans des systèmes d'eau pure ou salée (Vrbka et Jungwirth, 2005; Vrbka et Jungwirth, 2007) ou d'aliments surgelés (Zaritzky, 2005), permettent maintenant de contrôler ce processus pour tenter d'en tirer profit lors de la conception de matériaux. Il est possible de créer une congélation directionnelle menant à des feuillets ou à des structures poreuses orientées (Zhang et Cooper, 2007). Le processus se produit en créant un front de congélation directionnel, ce qui s'effectue en plaçant l'échantillon sur une surface dont la température est bien inférieure à celle de congélation du solvant (Mandal et Kundu, 2009). La formation des cristaux de glace est initiée au niveau de la surface en contact avec la zone réfrigérante, et la croissance du front de cristallisation s'effectue vers le centre de l'échantillon, tel qu'illustré sur la Figure 2.1 (Zhang et Cooper, 2007).

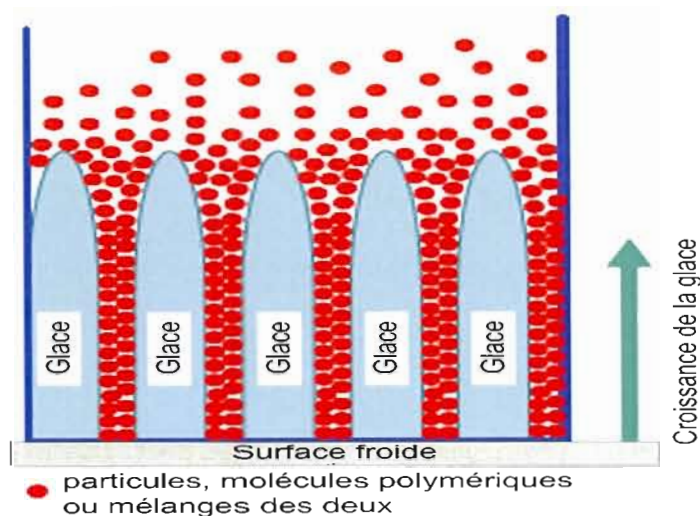


Figure 2.1 Schéma de la congélation directionnelle d'une solution polymérique. (Tiré de Zhang et Cooper, 2007)

L'ajout de molécules (surfactants, molécules bioactives, sels, etc.) dans les solutions peut modifier le système en interagissant avec les molécules d'eau ou de polymère lors de la congélation (Zaritzky, 2005). La température de congélation dépend alors des molécules dissoutes qui abaissent ainsi le potentiel chimique de l'eau liquide. Il peut en résulter une modification de la taille, de la quantité et/ou de la cinétique de formation des cristaux de glace (Zaritzky, 2005), affectant ainsi la morphologie finale des matrices 3D (Madhally et Matthew, 1999). Plusieurs méthodes sont utilisées pour caractériser la morphologie des matrices et les propriétés en découlant.

2.3 Méthodes de caractérisation des treillis tridimensionnels à base de fibroïne de soie

Les biomatériaux sont caractérisés sous trois aspects principaux : leur morphologie, leur structure moléculaire et leur capacité à remplir la tâche à laquelle ils ont été désignés. Les méthodes et techniques utilisées dans le cadre du projet de recherche pour étudier ces aspects sont décrites dans les sections suivantes.

2.3.1 Morphologie et propriétés mécaniques

Les aspects morphologiques des matériaux sont déterminants pour le passage de matrices 3D de matériaux à biomatériaux. Ils doivent respecter des critères tels la présence d'un réseau interconnecté pour la pénétration des cellules et l'irrigation de la matrice, ainsi que l'espace nécessaire pour une culture cellulaire viable.

2.3.1.1 La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est la méthode la plus utilisée pour obtenir une image de la morphologie d'un échantillon et ce, à une échelle de résolution de l'ordre du nanomètre. Bien que les images obtenues soient révélatrices et simples à interpréter, l'appareillage et le fonctionnement sont plutôt complexes.

La microscopie électronique à balayage donne une image électronique des échantillons. Elle consiste à émettre un faisceau aligné d'électrons à partir d'une cathode, accéléré en direction d'une anode de haut voltage située sous l'emplacement de l'échantillon, le tout dans un système sous vide (Hauch, 2004). Le faisceau atteint alors l'échantillon à une grande vitesse, pénétrant les atomes le formant. Les électrons primaires, soient ceux en provenance du faisceau, peuvent réagir de façon élastique avec les noyaux des atomes de l'échantillon. Ils sont alors projetés hors de l'échantillon, ou encore plus loin dans l'échantillon, avant d'en ressortir et d'être détectés. Ce sont les électrons rétro-diffusés et ils possèdent une énergie élevée (Hauch, 2004). De plus, les électrons primaires et les électrons rétro-diffusés percutent des électrons à l'intérieur des atomes de l'échantillon, les éjectant aussi. Ce sont les électrons secondaires et ils possèdent une énergie plus faible (Hauch, 2004). Tous les électrons projetés hors de l'échantillon sont détectés et, en fonction de leur énergie, il est possible de déterminer leur provenance dans l'échantillon, ce qui permet alors de reconstituer une image ayant un aspect 3D (Hauch, 2004). Afin de rendre ce processus possible, les échantillons doivent posséder une conductivité électronique adéquate. Si les échantillons conduisent mal les électrons, l'image obtenue sera de mauvaise qualité. Dans ce cas, il est recommandé de déposer une couche d'or uniforme à l'aide d'un plasma à la surface

des échantillons. Cependant, si la conductivité de l'échantillon est trop élevée, des problèmes d'effet de charge à leur surface peuvent être observés, ce qui produit des distorsions de l'image et peut fausser l'interprétation ou affecter la qualité du rendu final.

2.3.1.2 Les propriétés mécaniques

La microstructure des biomatériaux possède un impact majeur sur les propriétés mécaniques résultantes (Carew *et al.*, 2004). À la base, les biomatériaux de type matrices 3D doivent être suffisamment rigides et résistants pour permettre la culture de cellules, celles-ci créant habituellement une traction au niveau de la matrice lors de leur adhésion, leur croissance et leur organisation (Freyman, Yannas et Gibson, 2001). Les propriétés mécaniques nécessaires à ce niveau dépendent beaucoup du type cellulaire utilisé et de leur comportement organisationnel dans les matricesensemencées. S'ils sont ensuite destinés à être implantés, ils doivent aussi rencontrer les spécifications mécaniques au site d'implantation (Hutmacher *et al.*, 2001). Par exemple, les propriétés mécaniques d'un os spongieux humain se situent entre 5 et 10 MPa (Kim *et al.*, 2005b), valeurs auxquelles une matrice ensemencée de cellules devrait s'approcher pour favoriser la réussite de l'implantation lors de la réparation d'un défaut dans un tel site.

Les propriétés mécaniques quantifiables sont diverses. Elles incluent, entre autres, les forces de tension (traction), de compression et de cisaillement (Carew *et al.*, 2004). La méthode la plus courante utilisée pour caractériser les matrices 3D est la force de compression. La Figure 2.2 illustre le mécanisme d'une mesure en compression sur un échantillon cylindrique.

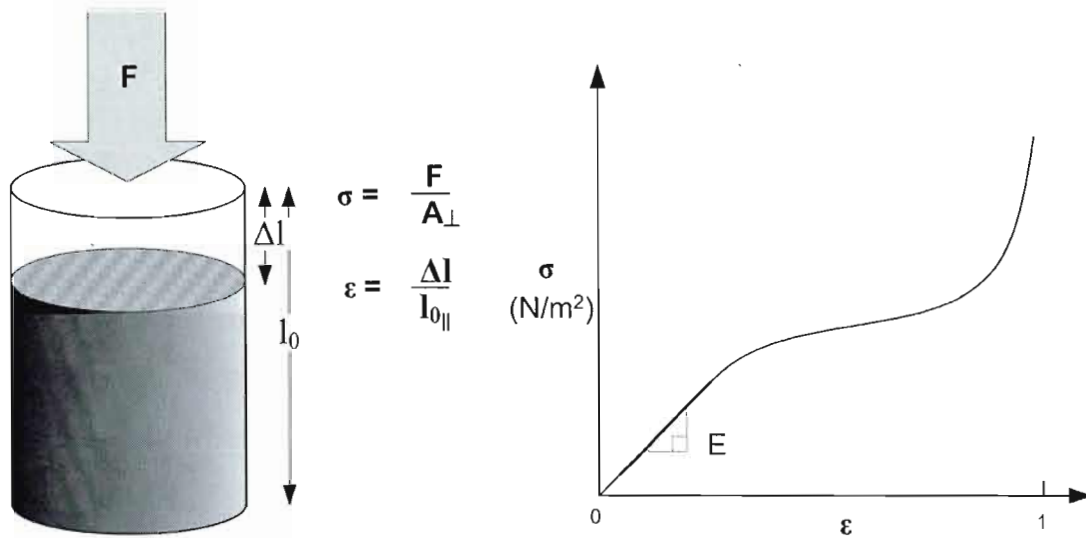


Figure 2.2 Représentation schématique des propriétés mécaniques mesurées par compression sur un cylindre et exemple de courbe obtenue. Le module de compression E (N/m^2) correspond à la pente de la droite dans la zone linéaire de compression.

Il faut d'abord connaître les dimensions de l'échantillon, ce qui est mesurable avec précision en utilisant un vernier. Une force de compression F (N) est ensuite appliquée perpendiculairement à l'échantillon. La force appliquée en fonction de la déformation Δl du matériau est enregistrée et, connaissant les dimensions initiales de l'échantillon, il est possible de déterminer la contrainte de compression σ (N/m^2) en fonction de la déformation globale de l'échantillon ε . Si le matériau possède un comportement élastique, il cherchera à reprendre sa forme initiale (Carew *et al.*, 2004). Il y aura alors une zone linéaire dans la courbe du stress de compressions en fonction de la déformation (Carew *et al.*, 2004). La pente de cette courbe correspond au module de compression E de l'échantillon et est liée à la constante de ressort du matériau (Carew *et al.*, 2004). Moins un matériau sera déformable, plus E sera élevé. Si la compression continue, la déformation devient alors irréversible et il y a apparition d'un plateau sur la courbe du graphique. Enfin, on observe une remontée brusque de la pente lorsque l'échantillon a atteint son maximum de compressibilité (i.e. il est détruit plutôt que déformé).

2.3.2 Caractérisation de la structure moléculaire

Les aspects moléculaires sont un deuxième facteur important à prendre en compte dans la conception de biomatériaux. Ils permettent souvent d'expliquer plusieurs comportements tels la solubilité, la dégradation, les propriétés d'assemblage macroscopique, les propriétés mécaniques, l'hydrophobicité, etc. Les méthodes utilisées pour caractériser la structure moléculaire des biomatériaux à base de fibroïne de soie préparés dans le cadre de ce projet de recherche sont présentés dans cette section.

2.3.2.1 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée (ATR-FTIR)

La spectroscopie du proche et du moyen infrarouge est une méthode analytique non destructive basée sur l'absorption ou la réflexion, par la matière, de radiations électromagnétiques se situant entre 1 et 50 μm (Rouessac et Rouessac, 2000). Le moyen infrarouge couvre la zone spectrale se situant entre 2,5 et 25 μm ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) et est riche en informations structurales sur les composés examinés (Rouessac et Rouessac, 2000). Les atomes de part et d'autre d'un lien chimique constituant un groupement fonctionnel sont animés de mouvements de vibrations formant un dipôle électrique oscillant à une fréquence précise. L'interaction entre les radiations électromagnétiques et les moments dipolaires dans les molécules peut être enregistrée sous forme d'un spectre d'absorbance en fonction de la fréquence (nombre d'ondes) (Rouessac et Rouessac, 2000). La fréquence d'absorbance d'une bande renseigne sur la nature des atomes impliqués dans la liaison chimique, sur le type de mouvements impliqués (déformations angulaires dans le plan ou hors du plan, élongations symétriques ou asymétriques) et sur la conformation du groupement fonctionnel. L'intensité et la largeur des bandes sont plutôt reliées aux types de mouvements de vibrations impliqués dans la molécule et à la dynamique moléculaire dans le système étudié (i.e. interactions intra ou inter-moléculaires).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une méthode de prédilection pour l'analyse de molécules contenues dans des matériaux de toutes formes. Elle s'avère utile pour déterminer la structure de protéines tant lors de processus d'agrégation en solution

(Allain, Paquin et Subirade, 1999) que dans la formation des biomatériaux (Li *et al.*, 2006). Pour les échantillons solides non transparents, il est nécessaire d'utiliser des procédés par réflexion afin d'obtenir un spectre infrarouge. Une des méthodes fréquemment utilisées à ces fins est la réflexion totale atténuée (attenuated total reflectance, ATR) (Figure 2.3). Le principe consiste à déposer l'échantillon sur un matériau trapézoïdal transparent dans l'infrarouge et possédant un indice de réfraction élevé, tel le germanium, un composite de zinc-sélénium (ZnSe) ou un diamant (Rouessac et Rouessac, 2000). Le faisceau optique est envoyé à travers ce cristal et effectue une ou plusieurs réflexions à l'interface entre ce dernier et l'échantillon. Lorsque le faisceau pénètre le cristal à un angle supérieur à l'angle d'incidence critique, la réflexion totale interne produit une onde évanescente à l'interface entre l'échantillon et le cristal. Ce faisceau réfléchi traverse le cristal et peut être absorbé par l'échantillon en contact avec lui. La profondeur de pénétration dans l'échantillon varie en fonction de la longueur d'onde du faisceau, de son angle d'incidence et de l'indice de réfraction du cristal, et ne représente que quelques micromètres. La succession de plusieurs réflexions totales atténuées conduit à un spectre comparable à celui obtenu en transmission (Fink, 2000; Rouessac et Rouessac, 2000).

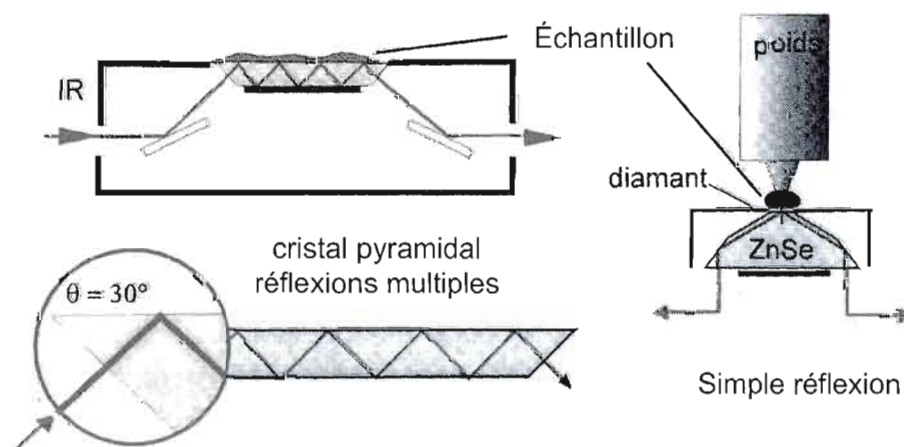


Figure 2.3 Schéma de modules d'ATR utilisés en spectroscopie FTIR. Le poids permet un meilleur contact entre l'échantillon et le cristal. (Tirée de Rouessac et Rouessac, 2000)

Cette technique a été utilisée afin de caractériser la structure moléculaire des matrices 3D à base fibroïne de soie préparées durant le projet de recherche. Il est en effet possible de déterminer la structure secondaire de protéines par FTIR en analysant les spectres dans les zones des bandes amides constituant le squelette peptidique (Singh, 2000). Les modifications de vibrations sont dues aux interactions par ponts hydrogènes variant entre les acides aminés (Singh, 2000).

Les vibrations amides impliquent les liens C=O, C-N et N-H des liens peptidiques et affichent des fréquences différentes en fonction du repliement de la structure secondaire des protéines. Trois régions spectrales ont été attribuées expérimentalement aux bandes amides, soit Amide I, Amide II et Amide III, respectivement situées entre 1600-1700, 1500-1600 et 1200-1350 cm^{-1} (Singh, 2000), tel qu'illustré à la Figure 2.4. Les mouvements vibrationnels ayant des contributions majoritaires dans les différentes bandes amides du squelette peptidique sont l'élongation C=O (Amide I), et les déformations angulaires N-H (Amide II) et l'élongation C-N (Amide III) (Singh, 2000). En fonction de la structure secondaire de la protéine, les interactions par ponts hydrogènes varieront et les couplages entre les différents modes vibrationnels modifieront l'allure des bandes amides. La bande Amide I est la plus utilisée pour déterminer des structures due à la forte intensité du signal dans cette région.

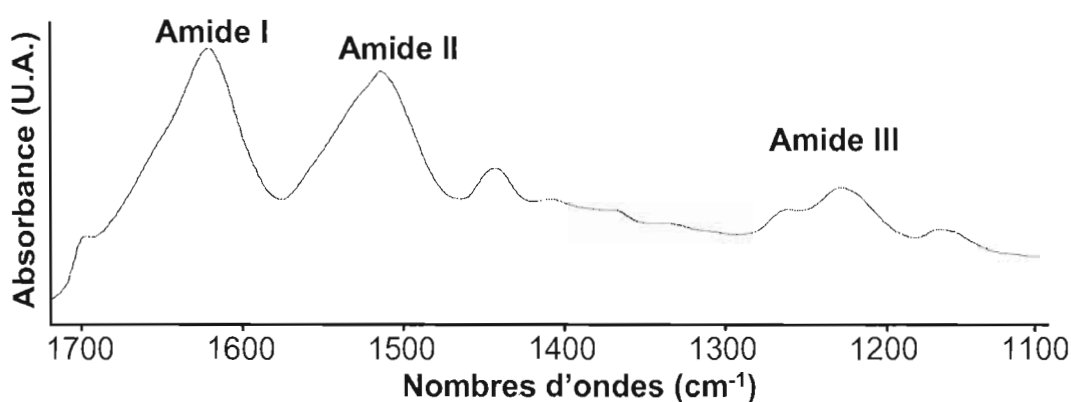


Figure 2.4 Spectre FTIR-ATR indiquant les trois bandes amides principales de la fibroïne extraite de la soie des fibres formant les cocons de *Bombyx mori*.

L'induction de feuillets β dans les matériaux à base de fibroïne de soie peut être validée en comparant le spectre de la fibroïne native avec celui des matériaux générés. En effet, il existe différents polymorphes dans la fibroïne de soie. Ces derniers seront présents en quantités variables selon les méthodes de préparation des matériaux ou du type de soie utilisée. Le polymorphe Silk I est désordonné et se retrouve surtout dans la fibroïne en solution. Il est majoritairement constitué d'hélices α et de structures désordonnées, conduisant à la solubilité de la fibroïne (Marsh, Corey et Pauling, 1955; He, Valluzzi et Gido, 1999). Le polymorphe Silk II est présent dans la soie tissée naturellement et est surtout constitué de feuillets β antiparallèles (Altman *et al.*, 2003). La transformation de Silk I vers Silk II dans les matériaux à base de fibroïne de soie se détecte avec l'apparition de bandes à environ 1695 et 1625 cm^{-1} (amide I), 1515 cm^{-1} (amide II) et 1260 cm^{-1} (amide III) (Chen *et al.*, 2001; Nam et Park, 2001; Asakura *et al.*, 2002; Nazarov, Jin et Kaplan, 2004).

2.3.2.2 La diffraction des rayons X

Les rayons X, comme la lumière visible ou infrarouge, font partie du spectre des radiations électromagnétiques et possèdent une longueur d'onde comprise entre 10 et 0,01 nm (Rouessac et Rouessac, 2000). Lorsqu'un échantillon est soumis à une radiation de rayons X, les électrons des atomes présents dans la matière dispersent les rayons incidents. La diffraction des rayons X est le résultat des interférences entre les radiations ayant été dispersées. L'interprétation du processus de diffraction des rayons X a été grandement simplifiée avec le concept de réflexion des rayons X par des plans cristallins successifs apporté par W. L. Bragg en 1913 (Figure 12.2) (Wilson, 1966).

Une structure moléculaire ou atomique répétitive et ordonnée peut être visualisée dans l'espace comme un agencement de plans parallèles avec des orientations précises. En irradiant avec des rayons X ces plans séparés entre eux par une distance d , il y aura un angle spécifique θ où les radiations dispersées vont se combiner et être considérées comme réfléchies par les plans cristallins. Il y aura une différence de trajet optique entre un rayon dispersé par le premier plan cristallin et celui réfléchi par le plan suivant. La différence de

trajet entre les faisceaux réfléchis et les plans cristallins successifs, tel que démontré sur la Figure 2.5, est représentée par l'équation suivante (Wilson, 1966) :

$$AB + BC = 2d \sin \theta \quad (2.1)$$

Seules les radiations électromagnétiques en phase, menant donc à des interférences constructives et à un multiple intégral (n) de la longueur d'onde (λ) utilisée seront observées en suivant la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (2.2)$$

n étant un nombre entier représentant l'ordre de diffraction (Wilson, 1966; Rouessac et Rouessac, 2000).

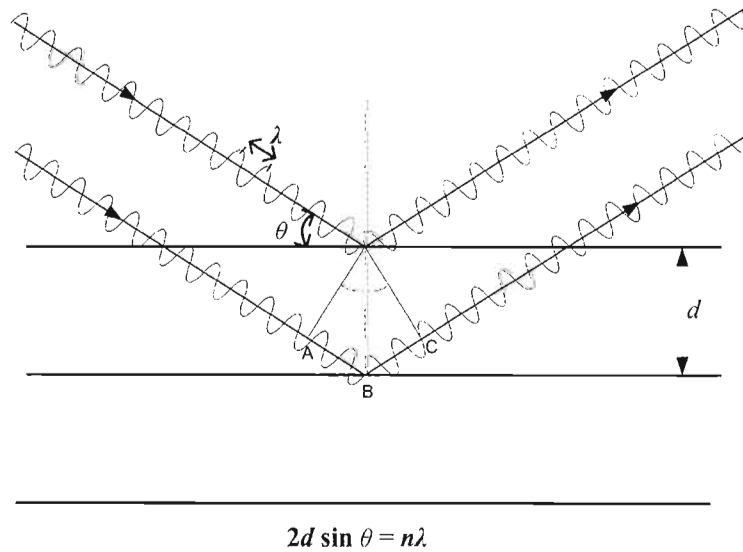


Figure 2.5 Représentation de la diffraction des rayons X par des plans successifs telle que démontrée par la loi de Bragg.

En balayant à différents angles un échantillon à l'aide d'une source monochromatique de rayons X, un patron de diffraction de l'intensité du signal en fonction de l'angle 2θ peut-être obtenu, permettant ainsi de calculer la distance d entre des plans cristallins. Dans les années 1950, Pauling et Corey ont réussi à déterminer la structure en hélices α de protéines fibreuses présentes dans les cheveux, les muscles, la peau et le sang grâce à la diffraction des rayons X (Pauling et Corey, 1951d; Pauling et Corey, 1951a). Ils ont aussi déterminé la structure en feuillets β parallèles et anti-parallèles et démontré l'implication de ces modèles dans la kératine β et la fibroïne de soie (Pauling et Corey, 1951c; Pauling et Corey, 1951b; Marsh, Corey et Pauling, 1955). La diffraction des rayons X s'avère donc un outil particulièrement utile afin de déterminer l'empilement cristallin des feuillets β dans la fibroïne de soie. Les transitions de la conformation Silk I (hélices α et structures désordonnées) vers Silk II (feuillets β) lors de la production des biomatériaux peuvent être suivies par l'apparition de bandes intenses à des angles 2θ d'environ 24, 20, et 9°, correspondant à des espacements d de 3.7, 4.3 et 9.8 Å. Ces espacements représentent les agencements des feuillets β dans la structure moléculaire de la fibroïne de soie (Nam et Park, 2001; Asakura *et al.*, 2002; Sashina *et al.*, 2006).

2.4 Fonctionnalité des biomatériaux à base de fibroïne de soie

L'étape finale dans la production de biomatériaux de types matrices 3D est la validation de leur efficacité lors de cultures cellulaires. Des facteurs tels la pénétration, la viabilité, l'adhésion, la migration et la prolifération des cellules sont à considérer en fonction de l'application finale visée. Le projet de recherche avait pour but ultime de vérifier la compatibilité des matrices 3D de fibroïne pour la culture de P19 en observant qualitativement la pénétration, l'organisation et la viabilité de ces cellules.

2.4.1 Culture cellulaire et étude de viabilité

Afin d'évaluer si les matrices 3D préparées dans ce projet de recherche constituent des supports à culture cellulaire adéquats, le comportement en terme d'organisation et de viabilité de cellules souches embryonnaires P19 cultivées en mode statique a été étudié.

Les P19 sont des cellules pluripotentes, i.e. qu'elles possèdent la capacité de se différencier en divers types cellulaires lors de leur développement (McBurney, 1993). Les avantages expérimentaux de leur utilisation incluent la simplicité relative de les faire croître et la quantité illimitée de matériel pouvant être obtenu (Skerjanc, 1999b). Ces cellules sont faciles à cultiver et à maintenir dans un état non différencié, mais elles peuvent aussi être différenciées par de simples manipulations des conditions de culture (McBurney *et al.*, 1982; McBurney, 1993). En effet, comme plusieurs lignées de cellules embryonnaires de carcinome, ces cellules se différencient lorsque cultivées à haute densité ou sous forme d'agrégats, et lorsqu'exposées à des concentrations non toxiques de certaines molécules actives (McBurney, 1993). Les molécules rapportées dans la littérature comme facteur de différenciation des P19 incluent l'acide rétinoïque (McBurney *et al.*, 1982; Edwards et McBurney, 1983), la triiodothyronine (Rodriguez *et al.*, 1994; Bouchard et Paquin, 2009), l'acide ascorbique (Takahashi *et al.*, 2003), le diméthylsulfoxyde (McBurney *et al.*, 1982; Edwards et McBurney, 1983; Skerjanc, 1999b), l'ocytocine (Paquin *et al.*, 2002; Bouchard et Paquin, 2009), l'oxyde nitrique (Kanno *et al.*, 2004) et certains facteurs de croissance tel les peptides de morphogenèse osseuse (BMP) (Angello *et al.*, 2006). Dépendant de la concentration du facteur de différenciation utilisé, du temps d'exposition avec les cellules ou de l'emploi d'une combinaison de ces agents, divers types cellulaires peuvent être obtenus, tels des neurones et cellules gliales, des cellules musculaires cardiaques et squelettiques, des adipocytes ou encore un mélange de différents types. Il est ainsi important que les matrices possèdent une morphologie adaptée à la culture cellulaire pour permettre leur pénétration, organisation et viabilité en vue d'une possible différenciation en un type cellulaire voulu.

Une des méthodes largement utilisées pour suivre le comportement et le positionnement de cellules étudiées consiste à les marquer avec des fluorophores, soit des molécules pouvant émettre de la fluorescence lorsqu'excitées par une longueur d'onde précise. Dans le processus, l'énergie d'un rayonnement incident est absorbée par un fluorophore, une molécule possédant habituellement plusieurs cycles conjugués, incorporé aux cellules (Hauch, 2004). La molécule perd d'abord une partie de cette énergie par dissipation calorifique, puis réémet le reste de l'énergie absorbée sous forme d'une radiation

électromagnétique de longueur d'onde plus élevée que celle d'excitation, donc plus faible énergétiquement (Rouessac et Rouessac, 2000). Une fois les cellules marquées, il est possible de les visualiser par microscopie de fluorescence et de déterminer plusieurs facteurs tels la croissance, la migration, la pénétration ou la viabilité de cellules, dépendant du type de fluorophore utilisé et de son mode d'action (Hauch, 2004).

Afin de suivre la pénétration, le positionnement et le comportement des P19 injectées dans les matrices 3D de fibroïne préparées dans le projet de recherche présenté, les cellules ont été incubées en présence d'ester de *N*-succinimidyl 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (CFSE). Cette molécule peut pénétrer la membrane des cellules et être convertie en un fluorophore par les estérases présentes dans le cytoplasme (Parish et Parish, 1999). Le fluorophore se lie alors de façon covalente avec les résidus amines ($-NH_2$) présents dans le système, permettant de détecter l'emplacement des cellules dans la matrice 3D par fluorescence lors de l'excitation par un rayonnement électromagnétique (Weston et Parish, 1990). La fluorescence est détectable jusqu'à environ huit cycles de divisions cellulaires, chaque cycle menant à une diminution d'environ 50% de l'intensité du signal (Weston et Parish, 1990; Parish et Parish, 1999). Cette molécule est souvent utilisée pour la microscopie à fluorescence ou la cytométrie en flux afin de classer et de quantifier certains types cellulaires ainsi que les cycles de division cellulaire (Parish et Parish, 1999).

De plus, la viabilité des cellules P19 injectées dans les matrices de fibroïne de notre projet a été suivie qualitativement en les incubant en présence d'iodure de propidium (PI). Le PI pénètre les noyaux des cellules nécrotiques ou apoptotiques dont les membranes nucléaires sont endommagées (Suzuki *et al.*, 1997; Lecoœur, 2002). La molécule s'intercale dans les brins d'ADN ou d'ARN au niveau des paires de bases azotées guanine et cytosine, produisant alors une fluorescence dans le rouge lorsqu'excitée par un rayonnement électromagnétique (Suzuki *et al.*, 1997). Dans notre cas, la viabilité, le positionnement et le comportement des cellules P19 déposées dans les matrices ont été observés par microscopie confocale à balayage laser, une variante de la microscopie à fluorescence.

2.4.2 Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie à fluorescence permet de visionner du matériel pouvant émettre de la fluorescence lorsqu'irradié par une source de radiations électromagnétiques particulièrement forte tel les lasers ou lampes à arcs au xénon ou mercure (Hauch, 2004). Les longueurs d'ondes nécessaires pour exciter les fluorophores sont d'abord sélectionnées à l'aide d'un filtre. La source d'excitation frappe ensuite un miroir dichroïque situé derrière l'objectif (Figure 2.6).

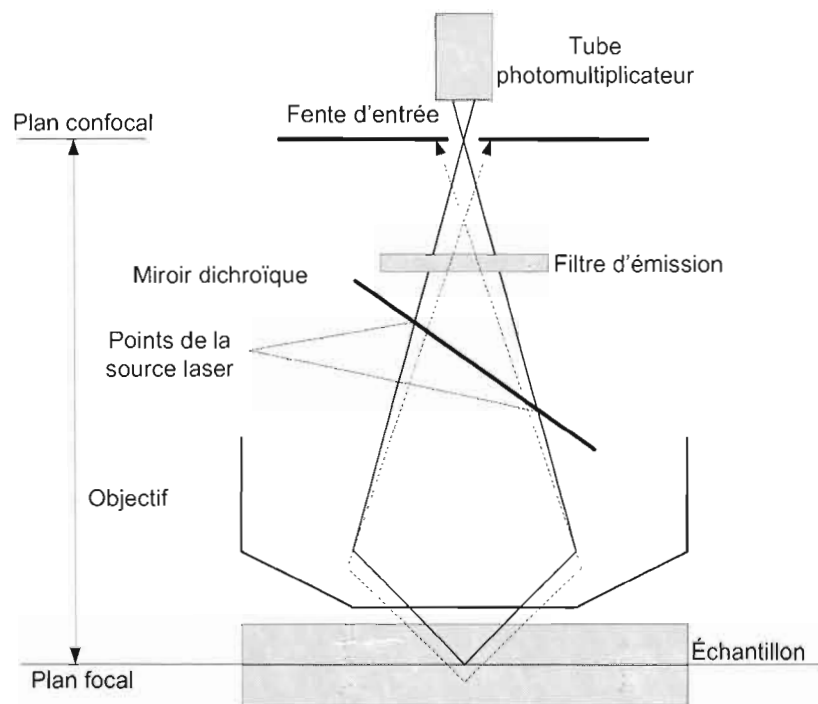


Figure 2.6 Schéma simplifié du fonctionnement d'un microscope confocal à balayage laser.

Le miroir dichroïque est conçu pour réfléchir les courtes longueurs d'ondes d'excitation, tout en laissant passer les plus longues que sont celles d'émissions. La source d'excitation est donc réfléchie et passe alors à travers l'objectif avant d'atteindre

l'échantillon, qui émet alors de la fluorescence. La radiation de fluorescence repasse par l'objectif et, possédant une longueur d'onde plus longue que celle d'excitation, peut alors traverser le miroir dichroïque. Cette onde de fluorescence atteint alors un dernier filtre, le filtre d'émission, servant à sélectionner la longueur d'onde d'émission voulue et rejetant toutes les autres émissions (Hauch, 2004).

Les fluorophores excités dans un échantillon émettent dans toutes les directions. En microscopie à fluorescence à champ large, la fluorescence détectée provient ainsi non seulement d'irradiation émanant du plan focal, mais aussi de molécules émettant légèrement hors de ce plan. Ce problème mène à des images parfois floues, surtout si l'échantillon est plutôt épais ou diffracte les rayons incidents (Hauch, 2004). La microscopie confocale à balayage laser est utilisée afin de résoudre ce problème.

Cette technique applique le même principe d'excitation de fluorophores et de détection de l'émission fluorescente, mais utilise une barrière physique (fente d'entrée) au niveau du plan confocal entre l'objectif et le détecteur (tube photomultiplicateur), tel qu'illustré sur la Figure 2.6. Cette fente d'entrée permet ainsi de détecter les radiations provenant du plan focal seulement. Aussi, un laser est utilisé comme source d'excitation dans ce type d'appareil.

L'utilisation d'un laser permet de créer un point de diffraction limité dans le plan de l'échantillon (Hauch, 2004). Ce point est ensuite balayé dans l'échantillon à l'aide de miroirs et autres matériaux pour l'optique et une image peut être reconstituée en fonction de l'intensité de fluorescence détectée à chaque point balayé. Le point de diffraction limité permet donc d'obtenir une résolution latérale exceptionnelle, tandis que la fente d'entrée rejette les émissions hors du plan focal. Le résultat est une image propre avec une excellente résolution représentant un mince plan optique tranché virtuellement à travers l'échantillon (Hauch, 2004). Finalement, le processus peut être répété à différents plans focaux en variant ces derniers à l'aide de micro-moteurs. Il est ainsi possible d'acquérir des images de différents plans focaux sur plusieurs micromètres (jusqu'à 200-300 μm) et de reconstituer le tout en une image 3D de la fluorescence détectée dans l'échantillon.

CHAPITRE III

CELL-CULTURE COMPATIBLE SILK FIBROIN SCAFFOLDS CONCOMITANTLY PATTERNED BY FREEZING CONDITIONS AND SALT CONCENTRATION

^{1,2}Frédéric Byette; ¹Frédéric Bouchard; ²Christian Pellerin; ¹Joanne Paquin; ¹Isabelle Marcotte*; ¹Mircea A. Mateescu*

¹Département de Chimie, Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888,
Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

²Département de chimie, Université de Montréal and Center for Self-Assembled Chemical
Structures (CSACS), Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

Corresponding authors: Isabelle Marcotte / Mircea-Alexandru Mateescu
marcotte.isabelle@uqam.ca / mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Cet article scientifique a été soumis au journal Polymer Bulletin et est en instance de révision. Le numéro de manuscrit est le PB-10-0497. Les parties expérimentales portant sur la préparation et la caractérisation des matrices 3D ont été effectuées par Frédéric Byette tandis que la partie portant sur la culture cellulaire a été effectuée par Frédéric Bouchard. La rédaction de l'article a été effectuée par Frédéric Byette dans un premier temps et les corrections et améliorations ont été effectuées par tous les co-auteurs, en fonction de leur champ d'expertise, dans un second temps.

3.1 Résumé

Des matériaux 3D poreux à base de fibroïne de soie séricicole ont été préparés pour utilisation en tant que support pour culture cellulaire. L'impact de l'addition de NaCl (0-250 mM) dans les solutions de fibroïne en simultané avec la variation de la température de congélation (-22°C ou -73°C) préalable à la lyophilisation ont été étudiés sur les structures moléculaires et les morphologies résultantes. Les matériaux obtenus ont ensuite été traités au méthanol pour induire leur insolubilité, puis immergés dans l'eau pour extraire le sel. Tel qu'observé par microscopie électronique à balayage (MEB), la morphologie des matrices préparées à -22°C est constituée d'un réseau poreux interconnecté devenant moins serré avec l'ajout de sel. Les biomatériaux préparés à -73°C possèdent plutôt une structure en feuillets orientés sur lesquels des filaments et micropores sont apparus lors de l'addition de sel. Aux deux températures de congélation, les matrices ont affiché un ratio de gonflement plus élevé et une résistance à la compression plus faible lors de leur préparation en présence de sel. Les différences morphologiques des matrices ont été corrélées avec les variations dans les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace lors de la congélation. L'étude des matériaux par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et diffraction des rayons X (XRD) a révélé un changement dans la structure secondaire de la fibroïne, passant d'un mélange d'hélices α et pelotes statistiques dynamiques, vers une structure majoritairement en feuillets β induite par le traitement au méthanol. Aucune différence n'a cependant été observée en fonction de l'ajout de sel ou de la variation de la température de congélation. La microscopie confocale à balayage laser a permis de constater que des cellules P19 ensemencées dans les matrices demeuraient viables et avaient pénétré la majorité des biomatériaux pour s'organiser en agrégats après 24 h de culture. Cette étude permet de conclure qu'il est possible d'adapter la morphologie de matrices 3D lyophilisées pour une utilisation comme support pour culture cellulaire.

Mots clés : fibroïne de soie, matrice 3D, culture cellulaire, lyophilisation, cristaux de glace, chlorure de sodium, température de congélation

3.2 Abstract

The morphology of freeze-dried silk fibroin 3D-scaffolds was modified by varying both the NaCl concentration and the freezing temperature of the silk fibroin solution prior to lyophilisation. Scanning electron micrographs showed that slow freezing at -22°C generated sponge-like interconnected porous networks whereas fast freezing at -73°C formed stacked leaflet structures. The presence of millimolar NaCl (50-250 mM) increased the porosity of the scaffolds and generated small outgrowths at their surface, depending on the freezing regime. Our results suggest that the morphological differences seen between the materials likely depend on ice and NaCl hydrate crystal nucleation and growth mechanisms. Infrared spectroscopy and X-ray diffraction analyses revealed that the salt concentration and freezing conditions induced no structural changes in fibroin. The seeding of P19 embryonic carcinoma cells showed that the presence of salt and freezing conditions influenced the cell distribution into the scaffolds, with salt addition increasing the access of cells to deeper regions.

Keywords: silk fibroin, scaffold, cell culture, freeze-drying, crystal nucleation and growth, sodium chloride concentration, freezing temperature, mechanical properties, spectroscopic characterization

3.3 Introduction

With the continuously growing interest in tissue engineering, there is an increasing need for porous three dimensional (3D) polymeric scaffolds to mimic the extracellular matrix of natural tissues and to promote cell migration, adherence, and proliferation into the structure (Agrawal et Ray, 2001; Kim *et al.*, 2005b). An interconnected porous network with appropriate pore size is essential to foster the transport of nutrients and wastes but also to favor cell migration into the structure and the formation of new tissue ingrowths when implanted into an organism (Zmora, Glicklis et Cohen, 2002; Hollister, 2005; Hofmann *et al.*, 2007). Numerous synthetic and natural polymers have been investigated for the development of scaffolds as potential biomaterials, including silk (Sofia *et al.*, 2001; Nazarov, Jin et Kaplan, 2004), polylactic acid, polyglycolic acid and their copolymers (Agrawal et Ray, 2001; Budyanto, Goh et Ooi, 2009), chitosan (Madihally et Matthew, 1999), collagen (Liu *et al.*, 2008), alginate (Zmora, Glicklis et Cohen, 2002), poly(alpha-hydroxy) acids (Hu *et al.*, 2002) and agarose (Stokols et Tuszynski, 2004). The nature of the polymeric material used to prepare scaffolds is critical since it must be biocompatible and possess adequate mechanical properties to support tissue function and integration at the implantation site. In several applications, it should also be biodegradable at a rate comparable with the growth of new tissue (Kim *et al.*, 2005b). Considering their amino acid or sugar based structures, natural biopolymers have the advantages of biocompatibility and biodegradability when compared to most of the synthetic ones (Lee et Mooney, 2001).

Despite the commercial availability of several materials and the constant progress made in controlling their mechanical characteristics, there is still a need for hypoallergenic biomaterials for tissue healing. Silkworm silk fibroin is a naturally occurring protein material that has been used for centuries in medicine as suture threads (Altman *et al.*, 2003; Vepari et Kaplan, 2007). Silk fiber from the *Bombyx mori* silkworm cocoon consist of two fibroin threads (core) surrounded by a sheath of sericin, a gummy water-soluble protein (Altman *et al.*, 2003; Mandal et Kundu, 2009). The silk fibroin is composed of two polypeptide subunits of about 350 and 25 kDa held together by a single disulfide bond (Perasso *et al.*, 2000). These proteins have a highly repetitive amino acid sequence mainly composed of glycine (45%), alanine (30%), and serine (12%) residues (Shen, Johnson et Martin, 1998; Vepari et

Kaplan, 2007). The particular sequence of these amino acids with small side chains leads to the formation of hydrophobic domains, thus allowing the formation of thick packs of hydrogen-bonded anti-parallel β -sheets (Shen, Johnson et Martin, 1998; Vepari et Kaplan, 2007).

Silkworm silk fibroin is a good candidate for biomaterial development because of its impressive mechanical properties, biocompatibility and biodegradability (Altman *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 2005; Servoli *et al.*, 2005). A variety of materials have already been processed from solubilized fibroin, including films (Lawrence *et al.*, 2008; Lawrence *et al.*, 2009), gels (Vepari et Kaplan, 2007), beads (Hino, Tanimoto et Shimabayashi, 2003), electrospun fibers (Zhu, Shao et Hu, 2007) and scaffolds (Vepari et Kaplan, 2007). Many routes have been explored to modulate the physical aspect of silk fibroin scaffolds. Among these, particulate leaching, gas foaming, electrospinning, freeze-thawing, and freeze-drying procedures have shown their efficiency to modify and template the morphology of the resulting materials (Li *et al.*, 2001; Nazarov, Jin et Kaplan, 2004; Kim *et al.*, 2005b; Tamada, 2005; Li *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2007; Vepari et Kaplan, 2007; Uebersax, Merkle et Meinel, 2008; Mandal et Kundu, 2009). The use of NaCl as porogen renders the leaching process biologically friendly as it is readily soluble in water. Also, the saturation of fibroin solutions with NaCl is known to induce a predominant β -sheet molecular structure in the resulting 3D scaffolds, thus yielding water insoluble porous materials (Kim *et al.*, 2005b). The freezing of water slurries prior to freeze-drying is an adaptable method for both the template formation (freezing of water) and the template removal (sublimation of ice). The ice crystals formed during the freezing process create a pattern in the material that is maintained after freeze-drying. This approach offers versatility of structural modification since the freezing process can be conducted such as to control ice crystal size and growth (Madhally et Matthew, 1999; Zmora, Glicklis et Cohen, 2002; Stokols et Tuszynski, 2004; Zhang et Cooper, 2007; Kwon, Kim et Jin, 2009). More specifically, the cooling rate, the freezing temperature and the initial concentration of the polymeric slurries, all affect the crystallization kinetics and, thus, the final morphology of freeze-dried scaffolds.

The modification of freezing conditions and the addition of NaCl crystals as porogens were methods used independently for scaffolds processing (Nazarov, Jin et Kaplan, 2004; Kim *et al.*, 2005b). It is worthy to note that porosity originating from salt treatment was controlled by the size of NaCl crystals added at saturation in fibroin slurries. In contrast with this method, the present work focused on the simultaneous variation of freezing and salt conditions using diluted NaCl solutions. This strategy was adopted with the aim of developing an accessible low-cost technique to design scaffolds with adaptable morphologies, thus fulfilling the spatial needs of different cells when used as cell-culture support. The resulting materials were evaluated in terms of their morphology, mechanical properties, and molecular structure after methanol treatment. Their suitability for cell-culture application was verified using model P19 carcinoma stem cells.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Preparation of silk fibroin aqueous solution

Cocoons of *Bombyx mori*, purchased from Tajima Shoji Co. Ltd (Yokohama, Japan), were boiled for 60 min in a 0.02 M Na₂CO₃ aqueous solution, then filtered and rinsed with hot distilled water to remove the sericin and wax coating from the silk fibroin threads. This process was repeated three times. The cleansed silk fibroin was then dissolved in a 9.3 M LiBr solution (1g fibroin/dL) at 50°C for 4 h. This solution was dialyzed for three days against distilled water using cellulose membrane tubing (MWCO 3500, Spectra/Por, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA). The final concentration of silk fibroin in the aqueous solution was about 3% (w/v), as determined by weighing the remaining solid after drying.

3.4.2 Silk fibroin scaffolds processing

Silk fibroin scaffolds were prepared by mixing a constant volume of the silk fibroin solution with an equivalent volume of various aqueous NaCl solutions. The final NaCl concentrations ranged from 0 to 250 mM. The resulting solutions were individually poured

into 12-well cell culture plates. Fast freezing was carried out by placing plates on the shelves of a freezer at -73°C while slow freezing conditions were obtained by enclosing plates in a polystyrene box at -22°C to prevent rapid ice crystal nucleation. After 24 h in freezers, the frozen solutions were lyophilized for three days. The resulting scaffolds were treated with methanol for 1 h to induce water insolubility (Ishida *et al.*, 2002), immersed in distilled water for 24 h to remove the salt and traces of solvent, and finally air dried in an oven at 50°C before utilization and characterization.

3.4.3 Swelling ratio and water uptake measurements

The scaffolds were immersed in distilled water for 24 h. The excess of water was removed and the weight of the wet samples (W_s) was measured. Samples were then dried at 50°C overnight before determining their dry weight (W_d). The swelling ratio and water content in the scaffold were calculated as follows:

$$\text{Swelling ratio} = (W_s - W_d)/W_d$$

$$\text{Water uptake (\%)} = [(W_s - W_d)/W_s] \times 100$$

3.4.4 Mechanical properties

Unconfined compression tests were performed on an Instron 3366 (Norwood, MA, USA) testing frame equipped with a 10 N load cell. The scaffolds were hydrated in 0.1 M Phosphate Buffer Saline (PBS) and submerged in a temperature-controlled Biopuls bath ($37 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$) filled with PBS for at least 2 min prior to testing. A strain control mode was used, with a crosshead displacement rate of 5 mm/min. The compressive stress and strain were calculated using the cross-sectional area (based on the sample casting size) and the sample height (measured automatically at a 0.02 N tare load). The elastic modulus was calculated by applying a least-squares fitting typically between 5% and 10% strain, based on the new sample height measured automatically. The compressive yield strength was determined using an offset-yield approach. A line was drawn parallel to the modulus line, but offset by 0.5% of

the sample gauge length. The corresponding stress value at which the offset line crossed the stress-strain curve was defined as the compressive yield strength of the scaffold.

3.4.5 Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD)

The scaffolds were cut axially using a razor blade and images of the cross-sectioned surfaces were acquired using a HITACHI S-4300SE/N VP-SEM (Toronto, ON, Canada) equipped with a Schottky field emission gun operating at 15 kV. The XRD patterns of freeze-dried scaffolds were obtained on a Bruker D8 Discover diffractometer (Madison, WI, USA) using a Hi-Star area detector and a Cu K α radiation source ($\lambda = 1.541838 \text{ \AA}$) operating at 40 kV and 40 mA. The distance between the detector and the sample was 8.0 cm.

3.4.6 Attenuated total reflectance (ATR) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

Infrared spectra of the scaffolds were obtained using a Bruker Tensor 27 spectrometer (Billerica, MA, USA) with a liquid nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride detector and a Pike MIRacle single reflection ATR accessory. Each spectrum was acquired by averaging 185 scans at a 4 cm^{-1} resolution. Spectra were baseline-corrected using **GRAMS/AI** v.7.00 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.4.7 Cell culture

P19 carcinoma embryonic stem cells were routinely cultured at 37°C in a propagation medium consisting of alpha-modified Eagle's minimum essential medium (α MEM; Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 50 U/mL penicillin and 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin under a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Passages were done every two days using trypsin and EDTA to detach the cells (Bouchard et Paquin, 2009). Before being seeded with cells, the silk fibroin scaffolds were cross-sectioned through the radial axis into two pieces, sterilized

by autoclaving at 121°C for 30 min, and hydrated with sterile PBS overnight. P19 cells were loaded with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE; Sigma, Oakville, ON, Canada) before seeding. For this, trypsinized cells were incubated for 15 min in PBS containing 30 μ M of the fluorescent dye, washed with PBS, suspended in the propagation medium, and seeded onto scaffolds. This was achieved by depositing a 100 μ L-suspension containing 1.5 millions cells onto the cross-sectioned surface of each scaffold using an automated micropipette. After a delay of 40 min to initiate cell penetration, the propagation medium was added to cover the scaffolds and culture was allowed for 24 h.

3.4.8 Confocal laser scanning microscopy

Distribution of cells onto and into the scaffolds was examined after the 24 h of culture using a BioRad MRC1024 confocal laser scanning microscope (Microscience, Cambridge, MA, USA). Prior to examination, silk fibroin scaffolds were transferred to new microwells, and 400 μ L of a PBS solution containing propidium iodide (100 μ g/mL) were gradually deposited onto the cell-seeded side of each scaffold. Propidium iodide impregnated the scaffolds, which were then placed on a microscope slide, the cell-seeded side in contact with the slide surface. Microscope examination and Z-scanning through the first 100 μ m from the slide surface was done using 488 and 535 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. The Z sections were clubbed together and reconstituted into 3D images with the Zeiss LSM Image Browser software (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON, Canada).

3.5 Results and discussion

3.5.1 Scaffolds processing and morphology

The freezing regime of material slurries such as those of silk, ceramics and carbon nanotubes was shown to critically affect the resulting morphology of lyophilized materials (Fukasawa *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Budyanto, Goh et Ooi, 2009; Kwon, Kim et Jin, 2009; Mandal et Kundu, 2009). On the other hand, the size of NaCl crystals saturating the fibroin slurries can be used to control porosity (Kim *et al.*, 2005b). In the present, work, we have

exploited the simultaneous influence of the freezing conditions and concentration of NaCl solutions on the silk fibroin scaffold morphology to prepare 3D-matrices for cell-culture applications. Moreover, we have been focusing on extreme cases in the scaffolds processing set-ups in order to better evidence the morphological differences. For this purpose, the scaffolds have been prepared either by slow freezing of fibroin solutions enclosed in polystyrene box at -22°C , or by fast freezing in direct contact with the freezer plate at -73°C . The NaCl concentrations into the frozen fibroin solutions were relatively low, ranging from 0 to 250 mM (Figure 3.1).

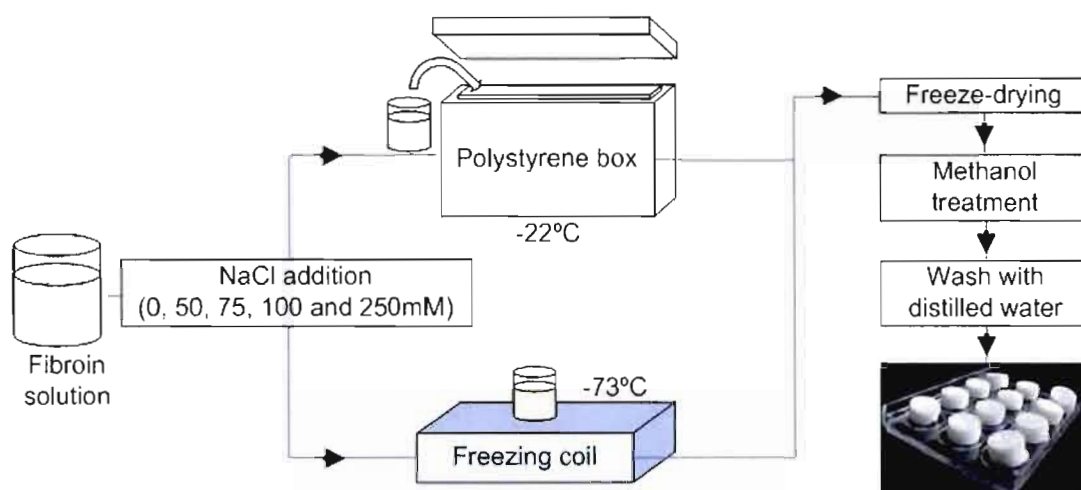


Figure 3.1 Scaffolds processing flowchart.

As a result of the slow cooling at -22°C in the polystyrene box, solutions gradually became cloudy as ice crystals were forming. The resulting scaffold structures obtained by varying the salt concentration before the cooling are revealed on SEM micrographs (Figure 3.2). Scaffolds processed without salt addition exhibited a dense and well-packed network of silk fibroin. As the concentration of NaCl added to the fibroin slurry increased, the network became more interconnected with more pores seen through the samples on SEM micrographs.

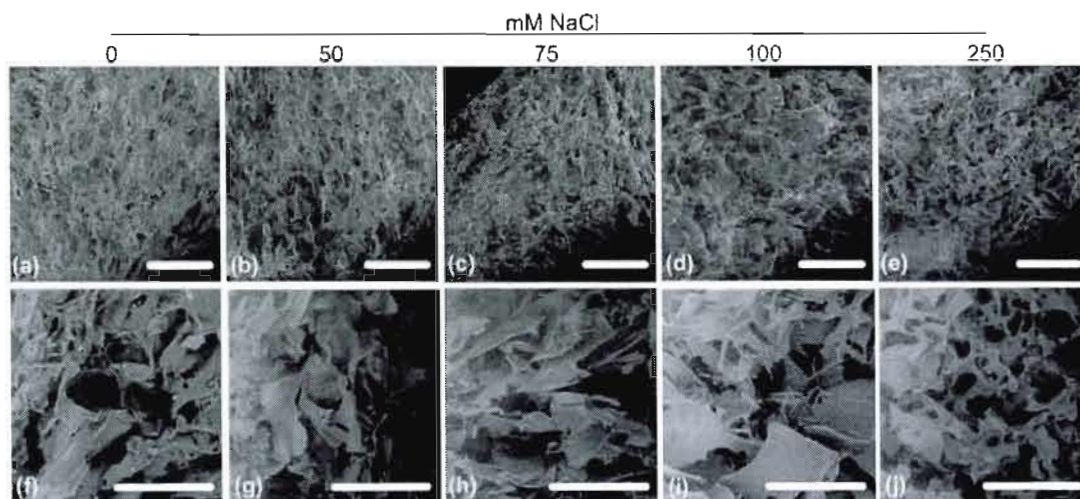


Figure 3.2 SEM micrographs of cross sectioned freeze-dried scaffolds prepared by freezing at -22°C with or without NaCl addition. The upper (a-e) and lower (f-j) row scale bars are 500 and 200 μm , respectively.

The final morphology of the scaffolds can be explained by the ice crystal formation during freezing. The eutectic temperature for the NaCl/water binary system is -21.1°C (Vrbka et Jungwirth, 2005; Carignano *et al.*, 2006; Vrbka et Jungwirth, 2007). Above this temperature, pure water freezes and excludes NaCl (and fibroin) towards the liquid phase. Because of the polystyrene shielding, the eutectic point (being near the nominal freezing temperature of -22°C) is slowly reached, and so is the transition across the liquid-solid equilibrium line to achieve complete freezing of the solution along with NaCl hydrate crystals formation. As pure water crystals are formed, a brine fibroin-enriched solution is created and favors protein-protein interactions. The slow freezing process therefore results in an entangled porous fibroin network (Figure 3.2j). The coexistence of a NaCl-enriched solution and ice crystals allows the formation of different structures within the fibroin scaffolds depending on the salt concentration employed because it affects the size of the water and NaCl crystals (Figure 3.2)

In contrast to the experiments done at -22°C , the scaffolds prepared at -73°C were in direct contact with the freezer surface and the cold atmosphere. Figure 3.3 shows SEM

micrographs of the resulting scaffolds as a function of salt concentration in the solution. All scaffolds were composed of partially oriented stacked leaf-like structures of silk fibroin. The leaflets appear as being more closely packed in samples with no or low salt concentration. With increased salt concentration, micropores can be observed through the fibroin leaflets, as evidenced in Figure 3.3 f-j and 3.4a

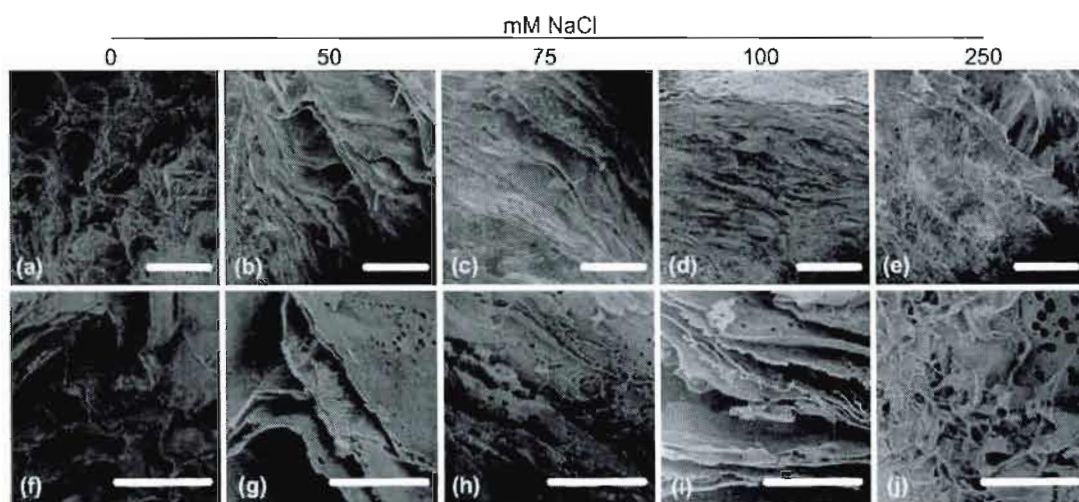


Figure 3.3 SEM micrographs of cross sectioned freeze-dried scaffolds prepared by freezing at -73°C with or without NaCl addition. The upper (a-e) and lower (f-j) row scale bars are 500 and 200 μm , respectively.

. It is worth noting that formation of fibroin scaffolds arranged almost entirely into stacked leaflets has rarely been mentioned in the literature. When observed, such leaflets were not abundant and rather dispersed into the scaffolds (Nazarov, Jin et Kaplan, 2004; Hu *et al.*, 2008). Finger-like structures were also formed on the surface of some leaflets (Fig. 3.4b and c). The increasing NaCl concentrations created more micropores and budding structures within the scaffolds. At the highest salt concentration (250 mM), the scaffold constructs looked less ordered as a result of increased porosity and number of finger-like outgrowths (Fig. 3.4d).

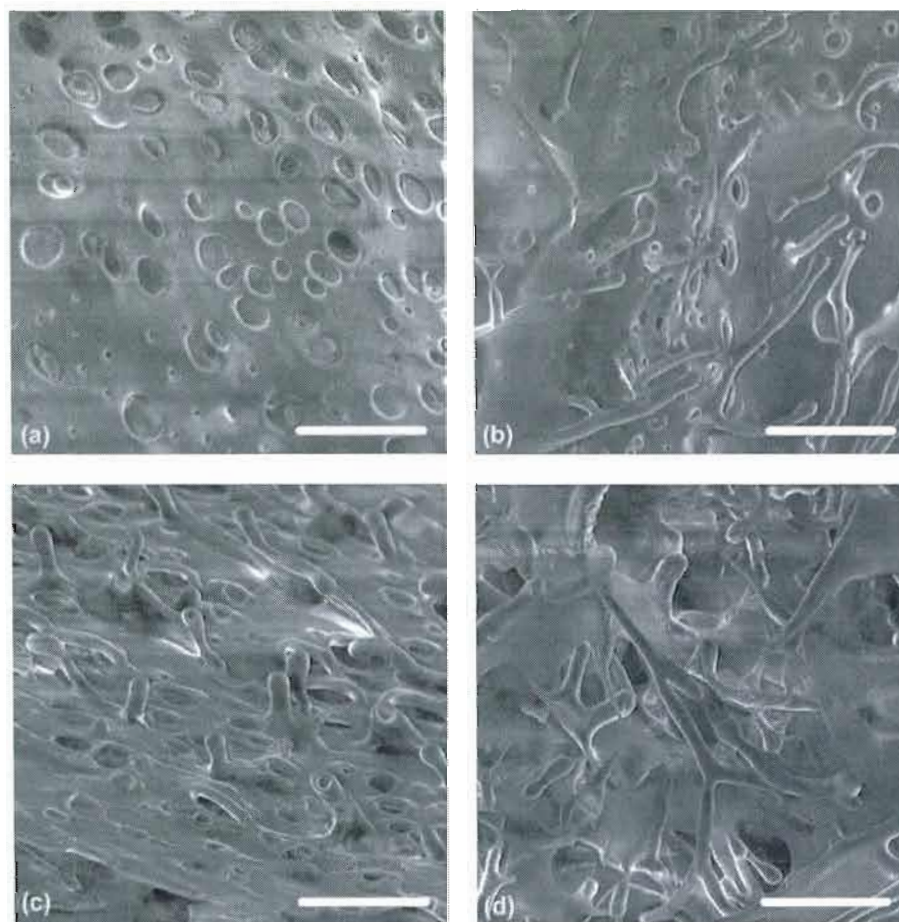


Figure 3.4 High magnification SEM micrographs of cross-sectioned freeze-dried scaffolds prepared by freezing at -73°C with a, 50; b, 75; c, 100 and d, 250 mM NaCl added before freezing. Scale bars represent $50\mu\text{m}$.

It is known that higher cooling rates (i.e. lower crystallization temperatures) produce more small ice crystals due to supercooling, and that nucleation mainly occurs in zones directly in contact with the refrigerant (Nam et Park, 2001; Zaritzky, 2005). This causes a directional growth of the ice crystals across the slurry, starting at the sites of contact with the cold surface and developing as walls and pillars towards the center of the sample (Zhang et Cooper, 2007). The solubilized fibroin and salt ions are expelled by the crystallization front and can concentrate between these walls, leading to viscous concentrated slurry zones. As the

cooling process continues, the water bound to salt ions and fibroin nucleates and smaller ice crystals can grow in the concentrated fibroin and salt slurry zone, leading to a final liquid-solid phase separation. Therefore, the process generates leaf-like structures between ice walls as well as the apparition of budding features on and between the fibroin leaflets (Figure 3.4). As reported by Nam et al. (Nam et Park, 1999) for poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) foams, the formation of these irregular outgrowths suggests that the thermally induced phase separation mainly occurs by a nucleation and growth mechanism. The generation of micropores in the leaf-like structures in the presence of salt may be the result of the exclusion of salt ions from the growing ice crystals. Upon freezing, salt ions migrate in the concentrated fibroin zones which, once below the eutectic temperature, can crystallize. When freezing is completed, hydrated salt crystals are entrapped within the leaf-like silk fibroin structures. The final washing step leaches the salt, leaving micropores where salt crystals were trapped.

Swelling ratio and water uptake were measured to further characterize the scaffolds (Table 1). For those prepared at -22°C , the swelling ratio rose from 14.8 to 19.5 and the water uptake from 93.7 to 95.1% in response to concentration of the NaCl solution in the process. This behavior was expected since SEM pictures in Figure 3.2 show development of a network containing more porous gaps with increasing salt concentration. Such organization facilitates swelling and water retention. The salt concentration also influenced mechanical properties (Figure 3.5). Both the compressive strength and compressive modulus decreased with addition of salt during scaffold processing, in agreement with results of Table 1. Indeed, a higher swelling ratio and water uptake can be expected to correspond to a weaker and more compliant structure.

Table 3.1 Swelling ratio and water uptake values of freeze-dried silk fibroin scaffolds

NaCl concentration (mM)	Swelling ratio		Water uptake (%)	
	-22°C	-73°C	-22°C	-73°C
0	14.8 ± 0.9	11.8 ± 1.9	93.7 ± 0.3	92.1 ± 1.2
50	15.5 ± 0.7	13.7 ± 0.8	93.9 ± 0.2	93.2 ± 0.3
75	15.6 ± 0.8	14.3 ± 1.5	94.0 ± 0.3	93.4 ± 0.7
100	15.9 ± 0.2	14.6 ± 0.8	94.1 ± 0.1	93.6 ± 0.3
250	19.5 ± 1.9	-	95.1 ± 1.4	-

Values are averages ± standard deviation (N=3)

Compression data could not be obtained for scaffolds treated with salt concentration higher than 50 mM because their low values were undetectable with the instrument used. Differences in mechanical strength between scaffolds were thus more pronounced than differences in swelling ratio and water uptake. Salt concentration likewise affected the swelling ratio, water uptake and mechanical properties of scaffolds processed at -73°C (Table 1 and Figure 3.5), although values were always lower with these scaffolds compared to their corresponding -22°C. The scaffold processed at -73°C and with 250 mM NaCl was mechanically too weak to give adequate measure of swelling ratio as the matrix easily collapsed, exuding water from the network. Although they show lower swelling capacities (Table 1), the lower values of compressive strength and modulus for the -73°C scaffolds may be explained by the preferential formation of leaflets over interconnected networks and the presence of more irregularities (micropores and finger-like outgrowths).

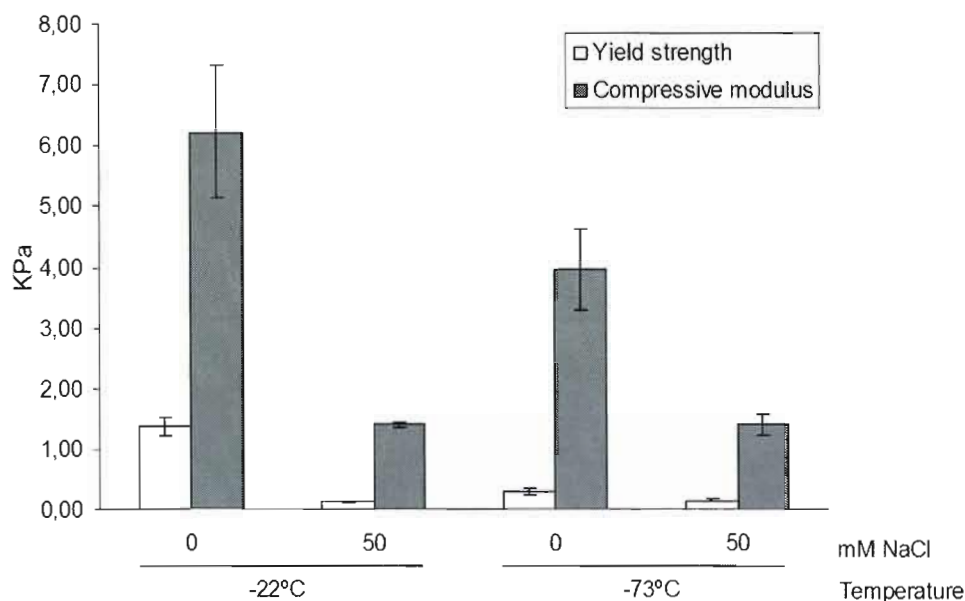


Figure 3.5 Mechanical properties of processed scaffolds. Values are averages $\pm$ standard deviation (N=3).

3.5.2 Evaluation of the molecular structure of the scaffolds

The secondary structure of silk fibroin in the scaffolds was studied in order to verify the potential effect of the freezing temperature and salt concentration. This was done by FT-IR spectroscopy and XRD. In the last few years, the molecular structure of silk fibroin has been thoroughly investigated in order to fully understand its organization mechanism (Marsh, Corey et Pauling, 1955; Shen, Johnson et Martin, 1998; Asakura *et al.*, 2002). Several silk fibroin polymorphs exist and are present in different ratios depending on the silk type and processing methods used. The Silk I structure is not well understood and has been assumed to be a mix of α -helix and random coil conformations (Marsh, Corey et Pauling, 1955; He, Valluzzi et Gido, 1999). This metastable structure is not desirable in regenerated silk fibroin materials due to its resulting water solubility. Spun silk fibroin is known to have a Silk II structure composed of anti-parallel β -sheets that confer water insolubility (Altman *et al.*, 2003). Many routes to induce β -sheet formation in regenerated silk fibroin materials have been explored, including low pH (He, Valluzzi et Gido, 1999; Vepari et Kaplan, 2007), mechanical (He, Valluzzi et Gido, 1999; Ishida *et al.*, 2002) or solvent (Nam et Park, 2001;

Ishida *et al.*, 2002; Vepari et Kaplan, 2007) treatments, high temperature (Lv *et al.*, 2005) or water annealing (Lawrence *et al.*, 2008) and processing with salts (Kim *et al.*, 2005b; Vepari et Kaplan, 2007). Among these, the most common approach to convert silk fibroin from a Silk I to Silk II structure is to add polar alcohols such as methanol or ethanol because of its ease of use and efficacy (Chen *et al.*, 2001).

As shown in Figure 3.6a, b and c, FT-IR spectra of the scaffolds processed at both -22°C and -73°C and not treated with methanol exhibit peaks related to Silk I structure at 1648 (amide I) and 1235 cm^{-1} (amide III), as reported by Nazarov *et al.* (Nazarov, Jin et Kaplan, 2004).

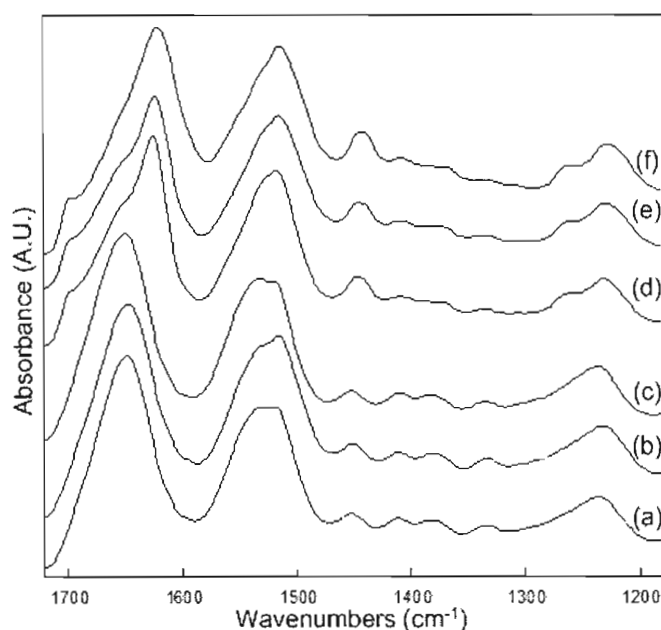


Figure 3.6 FT-IR spectra of freeze-dried silk fibroin scaffolds prepared: without methanol treatment nor salt at a) -73°C and b) -22°C; c) without methanol treatment and with 250 mM NaCl at -22°C; d) with methanol treatment and without salt at -73°C and e) with methanol treatment and without salt at -22°C. Spectrum f represents degummed silk fibroin threads.

The differences between the spectra are not significant enough to indicate a change in molecular structure induced by the freezing regime or by the addition of NaCl. Figure 3.6d and e show that the solvent-treated scaffolds adopt a predominant anti-parallel β -sheet conformation with peaks at 1698 and 1624 cm^{-1} (amide I), 1515 cm^{-1} (amide II) and 1261 cm^{-1} (amide III) (Nam et Park, 2001; Asakura *et al.*, 2002; Nazarov, Jin et Kaplan, 2004). These spectra are quite similar to the spectrum of degummed silk fibroin presented in Fig. 6f, but a shoulder at 1648 cm^{-1} is still present in the spectra of methanol-treated scaffolds. This can be attributed to the presence of residual silk I conformation in the regenerated fibroin secondary structure.

The information obtained by FT-IR spectroscopy is corroborated by the XRD patterns shown in Figure 3.7. The methanol-treated scaffolds prepared at the two different temperatures (c and d) present diffraction patterns similar to that of degummed silk fibroin (e). The crystalline peaks appear at about 24, 20, and 9° and correspond to d-spacings of 3.7, 4.3 and 9.8 Å, respectively, as reported in literature for a β -sheet conformation in silkworm silk fibroin (Nam et Park, 2001; Asakura *et al.*, 2002; Sashina *et al.*, 2006). The relative intensity of the peaks at 3.7 and 9.8 Å is lower for the solvent-treated scaffolds than for degummed silk fibroin threads. This is a further indication of the presence of residual Silk I conformation within the scaffolds, as noted in the FT-IR spectra of Figure 3.6. Indeed, the patterns of the non-treated scaffolds (a and b) are dominated by a diffuse halo centered at approximately 20° (4.3 Å). Since methanol was added after freeze-drying the samples, the molecular changes induced by methanol treatment may be only partial because of the lack of mobility of protein chains in the solid state. Finally, there is no evidence for a change in molecular structure induced by a modification of the freezing regime (Figure 3.7a and b) or by the presence of NaCl in the solution (data not shown).

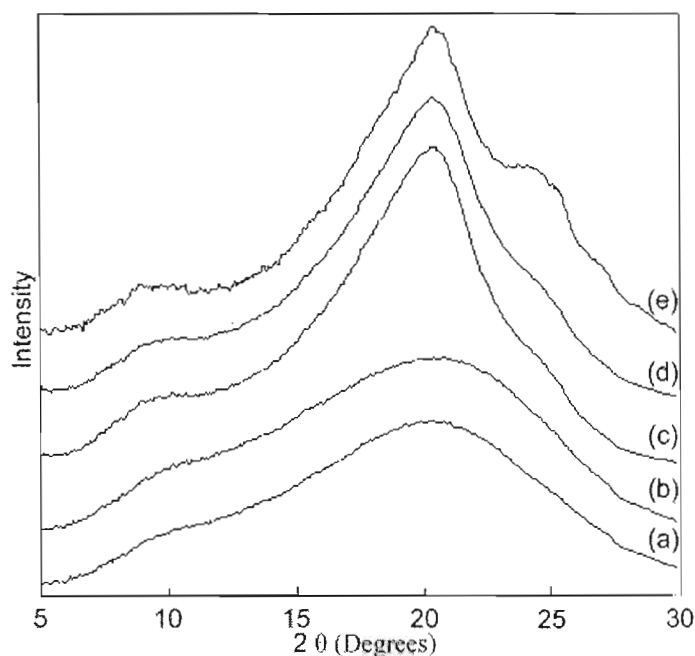


Figure 3.7 X-ray diffraction patterns of freeze-dried silk fibroin scaffolds (no added salt) without (a and b) and with a methanol treatment (c and d). Scaffolds were prepared at -73°C for patterns a and c and at -22°C for b and d. Pattern e represents degummed silk fibroin threads.

3.5.3 P19 cell culture in fibroin scaffolds

Numerous studies have already established the biocompatibility of silk fibroin scaffolds with cell culture by assaying the viability and the proliferation of various cell types (Velema et Kaplan, 2006). However, comparisons of the distribution of cells within these scaffolds have rarely been done. Cell distributions have been examined, for example, in fibroin-chitosane constructs (Chung et Chang, 2010). Given the two distinct morphologies of our scaffolds (sponge-like interconnected networks and leaflet stacks), we examined whether one or the other morphology favored cell penetration into the scaffold and whether the presence of salt in the solution was influential. The mouse P19 embryonic carcinoma cells were used in this series of experiments. These embryonic stem cells, often studied as a model of cell differentiation, have different spatial needs whether they are propagated as undifferentiated individual cells or are aggregated as multicellular spheroids to induce their

differentiation into various cell types such as neurons and cardiomyocytes (Rudnicki et al., 1987; Skerjanc, 1999a). The P19 cells were seeded onto the different silk fibroin scaffolds and imaged 24 h later using scanning confocal microscopy. Cells were loaded with the green fluorescent CFSE dye before seeding to follow their distribution in the scaffolds. The scaffold/cells systems were loaded with propidium iodide dye before microscopy (that is, 24 h post-seeding). This red fluorescent dye stained the scaffold matrix in brilliant red, allowing the combined visualization of cells and matrix. Propidium iodide also gave an orange color to dead cells labeled with CFSE, allowing the verification of cell viability. Less than 10% of cells escaped the scaffolds and grew on the plastic surface of culture wells by comparing with wells not containing scaffolds. Almost all cells remained alive after their seeding onto the biomaterials. Indeed, there were very rare orange spots on photomicrographs, as illustrated in Figure 3.8, and there were almost no floating cells in the culture supernatants.

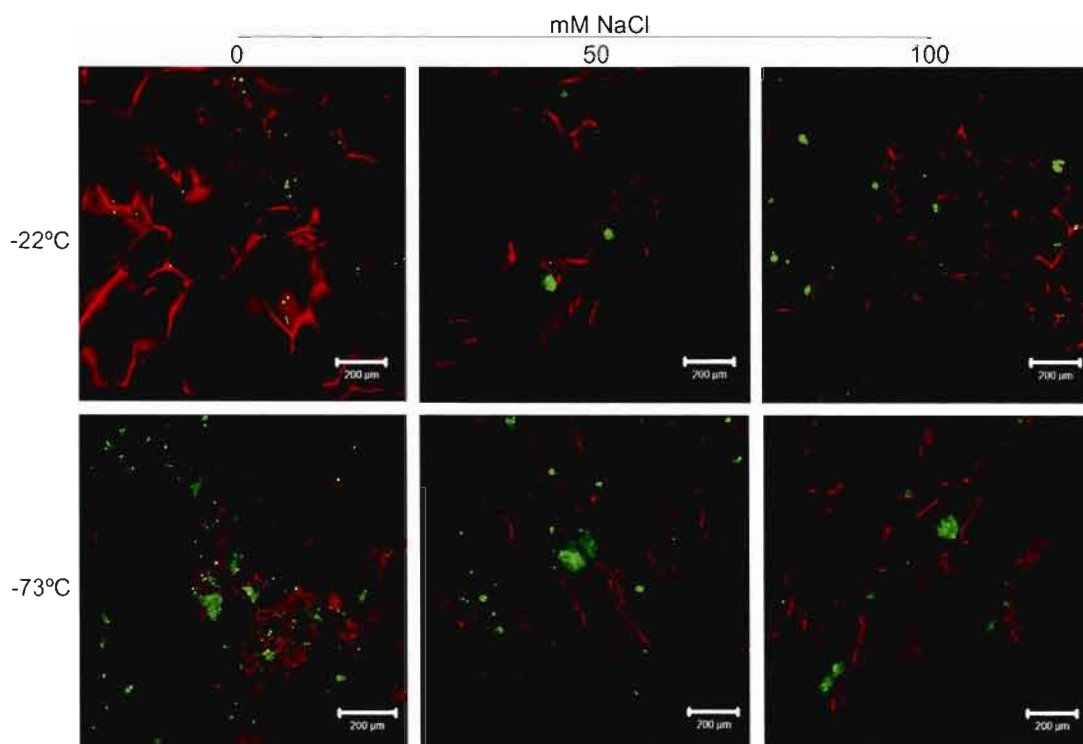


Figure 3.8 Confocal microscopy images of P19 cells seeded in freeze-dried silk fibroin scaffolds. Cells were labeled with CFSE to permit their visualization by green fluorescence. A second staining with propidium iodide, done at the end of the culture, marked dead cells with yellow-orange fluorescence. Propidium iodide also tinted the scaffold matrix in brilliant red, allowing appreciating cell and matrix organization. Images show cell distribution at the surface of scaffolds (at the cell-seeded side).

The freezing conditions and salt concentration affected the colonization of the scaffolds by cells. Figure 3.8 shows the cell distribution at the scaffold surface. The -73°C /no salt scaffold exhibited numerous cells, mostly individual, on its surface. The -22°C /no salt scaffold also showed individual cells although the number was greatly diminished. On the contrary, cells assembled into aggregates on scaffolds processed at either temperature in the presence of salt. Pores created by salt thus acted as niches that can accommodate many cells for subsequent aggregation. Furthermore, the budding features within the -73°C /salt processed scaffolds likely provided anchor points for cell clustering. We then determined

whether the processing conditions influenced cell penetration into the scaffolds. Figure 3.9 shows that high cell density at the surface of the -73°C /no salt scaffold correlated with low penetration.

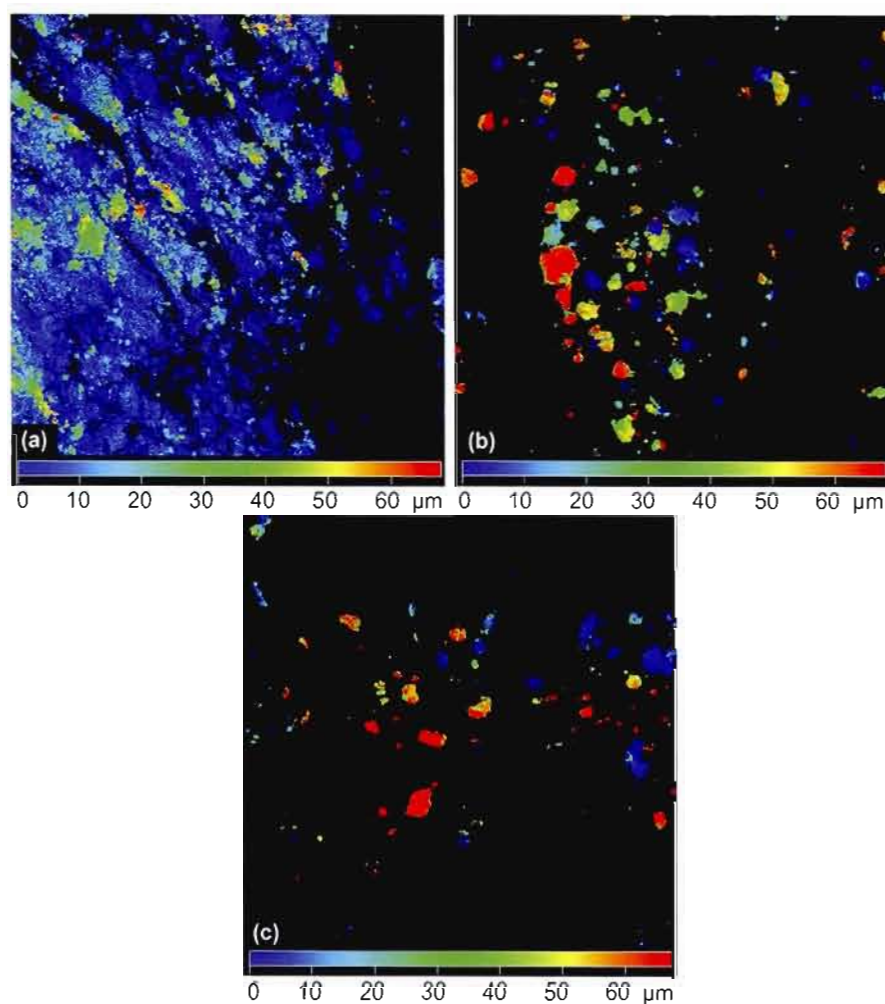


Figure 3.9 Reconstituted 3D confocal microscopy images illustrating the capacity of P19 cells to penetrate into scaffolds processed without NaCl at -73°C (a), and with 50 mM NaCl at -73°C and -22°C (b and c, respectively). The green CFSE fluorescence was color-coded as a function of the distance of the fluorescing cells within the scaffold, with the slide surface being at 0 μm. The penetration profiles of the other scaffolds resembled those of (b) and (c).

The closely packed fibroin leaflets of this scaffold may have hindered cell penetration and aggregation. In contrast, the use of NaCl solution, which increased the swelling ratio and created micropores, favored both phenomena. The budding features may preserve the housing spaces by preventing the collapse of fibroin leaflets. Cells found deeply in the scaffold were alive, in agreement with the known biocompatibility of silk fibroin. The viability of these cells attested the efficient mass transfer of nutrients and waste across the scaffolds. Formation of cell aggregates in the scaffolds is an interesting finding considering the importance of aggregation in the differentiation of P19 cells. In addition, the size of the cell aggregates formed within the scaffolds were comparable to those prepared in Petri dishes, suggesting that differentiation could be effective in the scaffolds.

3.6 Conclusions

This study showed that the physical aspect of 3D silk fibroin scaffolds can be efficiently tuned by varying simultaneously the freezing temperature and salt concentration of the biopolymer slurries. Slow freezing at -20°C generated sponge-like networks with interconnected pores, a morphology obtained under a large variety of conditions. However, the formation of multilayered silk fibroin scaffolds with stacked leaflets, such as those we obtained by fast freezing at -73°C , has seldom been reported in the literature. The multilayered scaffolds could find applications for cell cultures requiring cell alignment. This work also showed that the matrix microporosity can be modified with salt concentration, thus affecting the swelling ratio and the mechanical properties of the scaffolds. In addition, the presence of salt in the fast-frozen fibroin solutions generated finger-like structures which, together with the micropores, can modulate the dimensions of the cell housing spaces within the scaffolds. Indeed, the use of NaCl solutions promoted penetration as well as aggregation of the P19 cells. The relative simplicity of this methodology opens the way for a morphological template optimization of silk fibroin scaffolds that could be designed for a variety of cell support applications including oriented cell cultures and preparation of porous tissues.

3.7 Acknowledgements

We are grateful to R. Mineau and D. Flipo for their help with the SEM and scanning confocal microscopy images, respectively. We are also very thankful to D.L.. Kaplan and J.A. Kluge (Tufts University) for their kind assistance with the mechanical testing. F.B. thanks Pharmaqam for the award of a scholarship. This work was partly supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (I.M., C.P. and M.A.M) and the Canadian Institutes for Health Research (J.P.).

CHAPITRE IV

UTILISATION DE PROTÉINES DE SOJA ET D'AMIDON RICHE EN AMYLOSE DANS LA PRÉPARATION D'EXCIPIENTS POUR FORMULATIONS PHARMACEUTIQUES

Ce chapitre porte sur un projet effectué durant ma maîtrise dont le sujet est toujours lié aux matériaux à base de protéines, mais différent du thème principal du mémoire. Le fond de ce chapitre est en lien avec un autre domaine de recherche très large qui ne sera ici qu'effleuré, le développement de formulations pharmaceutiques.

4.1 Introduction

La libération de molécules actives par des formulations pharmaceutiques monolithiques administrables par voie orale est un large secteur de recherche dont certains principes de base sont abrégés dans cette section. La méthode consiste à piéger la molécule thérapeutique voulue dans un excipient qui pourra ensuite libérer cette dernière lors de la solubilisation, l'érosion, la dégradation ou le gonflement de la formulation en contact avec les fluides gastriques et/ou intestinaux. La molécule libérée dans le tractus gastro-intestinal peut alors être absorbée par le patient pour générer l'effet thérapeutique escompté. Plus précisément, l'agent bioactif peut-être libéré à différents endroits du tube gastrique ou intestinal, offrant ainsi une thérapie ciblée ou favorisant l'absorption du médicament. Dans la plupart des cas, pour le confort des patients, une cinétique de libération contrôlée du médicament est désirable afin d'éviter la prise de plusieurs doses dans la même journée, tout en procurant l'effet thérapeutique voulu (Chawla *et al.*, 2003). Une libération trop lente, menant à des concentrations de médicaments dans le plasma sanguin trop faibles, n'aura pas d'effet chez le patient, alors qu'une concentration trop élevée génère habituellement des effets secondaires indésirables, voir néfastes pour la santé (Chawla *et al.*, 2003). Ainsi, la

concentration d'actif libéré doit se situer dans la fenêtre d'absorption du médicament pour rencontrer les critères de biodisponibilité permettant de générer un effet thérapeutique.

La voie orale étant privilégiée lors de la prise de médicaments, et ces derniers variant grandement dans leur nature (morphologie, charges partielles, solubilité en milieu aqueux de différents pH, etc.), il est nécessaire de développer différents systèmes visant la libération de molécules actives à partir d'excipients (Losi *et al.*, 2006). Les excipients utilisés doivent permettre de soutenir la biodisponibilité des principes actifs à travers le tractus gastro-intestinal, en libérant l'actif aux endroits ciblés et en concentrations désirées (Chen, Remondetto et Subirade, 2006; Losi *et al.*, 2006). Ceci représente un défi important puisqu'il faut prendre en considération le temps de résidence gastrique, les variations de pH et de force ionique, en plus de l'éventuelle instabilité face à la dégradation enzymatique dans les différentes régions du système gastro-intestinal (Chourasia et Jain, 2003; Mulhbacher, Ispas-Szabo et Mateescu, 2004; Chen, Remondetto et Subirade, 2006). Il faut donc développer des systèmes à libération de médicaments permettant de conserver l'intégrité des molécules actives lors de leur passage dans le système gastro-intestinal, tout en favorisant la relation absorption-biodisponibilité générant l'effet thérapeutique désiré.

Afin d'obtenir des matrices biocompatibles et biodégradables sécuritaires pour la santé, des excipients d'origine naturelle tel l'amidon, un biopolymère hydrophile constitué d'unités de glucose avec liens α -glycosidiques, sont de plus en plus étudiés. Les polymères à base d'amidon riche en amylose (ARA) modifié physiquement (gélatinisation) ou chimiquement (fonctionnalisé et/ou réticulé) ont été largement étudiés ces dernières années à des fins de libération contrôlée (Lenaerts *et al.*, 1998; Mulhbacher *et al.*, 2001; Nabais *et al.*, 2007). La stabilisation des matrices lors d'une réorganisation des chaînes polymériques (amylose) par l'intermédiaire de ponts hydrogènes peut moduler l'entrée d'eau, donc la libération d'actifs. Plusieurs types de libération ont été obtenus avec différents traceurs et différents types d'amidon modifié (Mulhbacher *et al.*, 2001; Calinescu *et al.*, 2005).

D'autre part, des protéines peuvent également être utilisées pour réaliser des formulations à des fins de libération contrôlée (Liu *et al.*, 2006). Cependant, ces dernières peuvent rencontrer des problèmes de dégradation par les enzymes protéolytiques du système

gastro-intestinal et subir des variations de structure en fonction du pH (Chen, Remondetto et Subirade, 2006). Il est cependant intéressant de mettre en valeur ces variations de comportements et les propriétés tampons des protéines pour stabiliser des formulations pharmaceutiques ou nutraceutiques lors de ce passage dans le système gastro-intestinal. La vaste gamme d'acides aminés différents dans les polypeptides permet des interactions de nature multiple (liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes et interactions électrostatiques) pouvant être utilisées pour cibler la libération d'agents actifs (Chen, Remondetto et Subirade, 2006).

Dans cette optique, un ensemble de matrices naturelles et biocompatibles a été étudié en associant un polymère d'ARA avec un isolat de protéines de soja majoritairement constitué de globulines. Les globulines de soja peuvent s'organiser entre elles pour former des trimères ou des hexamères ou, lorsque dénaturées, se réorganiser en agrégats et filaments avec des propriétés plus hydrophobes qu'à l'état non-dénaturé (Puppo, Lupano et Anon, 1995; Chen, Remondetto et Subirade, 2006).

4.2 Hypothèses et objectifs

Plus de 30% des acides aminés des protéines de soja sont constitués d'acide aspartique et glutamique (Ishihara *et al.*, 2003), offrant la possibilité d'agir tel un tampon lors de leur contact avec le milieu gastrique. De son côté, il est estimé que l'ARA possède la capacité de moduler la libération de molécules actives par stabilisation à l'aide de ponts hydrogènes inter et intra-chaînes. Dans ce sens, le but de ce projet était d'évaluer le potentiel d'un excipient à base d'isolat de protéines de soja, la Prolisse (Pro), mélangé avec de l'ARA gélatinisé pour la libération de molécules actives lors d'une utilisation par voie orale. L'hypothèse de départ suppose une possible stabilisation des formulations monolithiques par des interactions intermoléculaires favorables entre le polysaccharide et l'isolat de protéine utilisé.

Les méthodes de préparation de ces excipients composés ont été variées afin de déterminer s'il était possible d'obtenir une co-stabilisation des formulations lors d'un

mélange de poudres préalable à une compression directe dans un moule pour former des comprimés. Les processus de préparation des excipients utilisés ont été le mélange mécanique des poudres de Pro et ARA et les mélanges en milieu aqueux suivi de co-séchages par congélation-lyophilisation ou atomisation pour obtenir des particules. Pro et ARA seuls ont aussi été préparés par les mêmes méthodes comme témoins pour comparaison. La morphologie des particules d'excipients a été observée par MEB. Les poudres ont aussi été caractérisées pour déterminer les propriétés d'écoulement et de compression, la solubilité des protéines en milieu aqueux et le pourcentage d'eau libre et liée adsorbée. La dureté des comprimés sans actif a été quantifiée. Les profils de libération d'un traceur en fluides gastrique et intestinal simulés (SGF et SIF) ont été établis en absence et présence d'enzymes (pepsine dans le SGF et pancréatine dans le SIF).

4.3 Matériel et Méthode

4.3.1 Préparation des excipients

ARA initial : Hylon VII, un amidon de maïs avec 70% d'amylose, a été gélatinisé en le traitant en milieu alcalin (NaOH 1,5M) à 50 °C durant 30 minutes avant de neutraliser le milieu avec une solution d'acide acétique. L'ARA gélatinisé a ensuite été lavé/précipité sous agitation à trois reprises par des solutions acétone:eau 70% (v/v) et déshydraté lors d'une précipitation finale à l'acétone 100%.

Pro initiale : Protéines de soja fournies par le fabricant (Prolisse)

Mix mécanique (mec) : Mélange 1:1 de Pro initiale et ARA initial

Produits atomisés (at) : De l'ARA, Pro et Mix mécanique des produits initiaux ont été suspendus séparément dans de l'eau distillée (20 g / 300 mL) à pH neutre, et agités durant 6 h à 23°C avant d'être séchés par atomisation. La température d'entrée de l'atomiseur Büchi mini spray dryer B-290 (Flawil, Suisse) était de 200°C, avec une vitesse de pompe de 20 %, une entrée d'azote à 40 et une aspiration à 80 %, menant ainsi à une température de sortie des produits se situant entre 75 et 83°C.

Produits lyophilisés (lyo) : De l'ARA, Pro et Mix mécanique ont été suspendus séparément dans de l'eau distillée (12% m/v) à pH neutre, agités 6 h à 23°C avant d'être congelés 24 h à -73°C, puis lyophilisés durant 72 h. Les produits générés ont finalement été broyés à l'aide d'un pilon et d'un mortier.

4.3.2 Propriétés d'écoulement des poudres

Densité *Bulk* : Ce test a été effectué conformément aux normes du United States Pharmacopeia 24 and National Formulary 19 (USP24/NF19), section 616, méthode 1. Une masse (m) connue des excipients a été placée délicatement dans un tube gradué et le volume (V_0) occupé a été enregistré. Le rapport m/V_0 représente la densité *Bulk* en g/mL.

Densité après tassement : Ce test a été effectué conformément à la norme USP24/NF19, section 616, méthode 1. Le tube gradué avec l'excipient a été placé dans un appareil Vankel Tap Density (Mississauga, Canada) conçu pour effectuer des mouvements de haut en bas afin de taper la poudre. Le tube a été tapé 500 fois avant d'enregistrer le volume (V_a), puis 750 fois (V_b) avant de vérifier si le volume était toujours le même avec une erreur inférieure à 2%. Si l'erreur était plus élevée, le tout a été recommencé par incréments de 1250 tapes. Le volume final (V_f) a été enregistré et la densité calculée par m/V_f en g/mL.

$$\text{Rapport de Hausner :} \quad RH = V_0/V_f \quad (4.1)$$

$$\text{Indice de compressibilité :} \quad IC = 100((V_0 - V_f)/V_0) \quad (4.2)$$

4.3.3 Solubilité des protéines

Des aliquotes des différents excipients précisément pesés ont été agités magnétiquement durant 60 minutes dans de l'eau à pH neutre (10 mg/mL) avant d'être centrifugés à 2500 rpm durant 30 minutes afin d'analyser le surnageant par la méthode de Bradford. La courbe d'étalonnage a été effectuées avec de l'albumine de sérum bovin. La réaction entre les protéines et le bleu de Coomassie brillant G-250 a été analysée sur un lecteur de microplaque

spectrophotomètre UV-Visible à 595 nm. Le pourcentage de solubilité a été déterminé en calculant la masse détectée en solution par rapport à la masse totale mise en solution.

4.3.4 Contenu en eau

Les différents excipients ont été équilibrés à l'air ambiant puis passés dans un analyseur thermogravimétrique (TGA) Seiko TG/DTA 6200 (Torrance, CA) pour déterminer le contenu en eau totale adsorbée. Dans un autre temps, les poudres ont été placées à température de la pièce dans une étuve sous vide en présence de Drierite jusqu'à masse constante avant d'être aussi analysées par TGA pour en déterminer le contenu en eau liée. La vitesse de chauffe était de 10°C par minute entre 25 et 600°C. La différence entre le contenu total en eau et le contenu en eau liée représente l'eau libre, le tout rapporté à la masse totale de l'échantillon.

4.3.5 Dureté des comprimés

Des comprimés de 200 mg de chacun des excipients (N = 3) ont été préparés dans un moule de 9,8 mm de diamètre par compression directe à 3 tonnes. La dureté a été enregistrée à l'aide d'un appareil Vankel VK200 (Mississauga, Canada) automatisé.

4.3.6 Profils de libération

Les profils ont été établis en suivant les normes USP24/NF19, section 711, appareillage type 2. Le SGF est préparé en solubilisant 2 g de NaCl dans 1 L d'eau distillée dont le pH est ajusté à 1,2 avec de l'acide chlorhydrique concentrée. 3,2 g de Pepsine, possédant une activité se situant entre 800 et 2500 unités par mg, sont ajoutés au SGF pour les tests de libération en présence d'enzymes. Le SIF est préparé en solubilisant 6,8 g de Phosphate de sodium monobasique dans 1 L d'eau distillée dont le pH est ajusté à 6,8 avec du NaOH. 10 g de pancréatine rencontrant les standards USP sont ajoutés au SIF pour les tests en présence d'enzymes digestives.

Des comprimés de 200 mg au total avec 20% d'hydroxyquinoline hemisulfate hemihydrate (HQN) ont été préparés par compression directe (3 tonnes) des différents excipients dans un moule de 9,8 mm de diamètre. Les comprimés ($N = 3$) ont été placés dans un système à dissolution Distek Première 5100 (Toronto, Canada) en présence de SGF avec et sans pepsine durant 120 min, puis transférés dans le SIF avec et sans pancréatine. La température du bain était de 37°C avec une vitesse de rotation des hélices de 50 rpm. La libération de HQN en fonction du temps a été détectée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à $\lambda = 350$ nm (SGF) et 340 nm (SIF), la différence de longueur d'onde étant due au déplacement du maximum d'absorption de HQN en fonction du pH.

4.4 Résultats et Discussion

La morphologie des particules constituant les excipients a d'abord été observée par MEB. La taille et la forme des particules peuvent parfois servir d'indice pour comprendre les propriétés des comprimés, à savoir leur dureté après compression et leur comportement lors de tests de dissolution. Tel qu'illustré sur la Figure 4.1, Pro initiale est constituée de particules globulaires ridées, comme tous les produits obtenus par atomisation, mais de tailles généralement plus élevées que ces derniers. Les produits hydrophiles atomisés possèdent souvent cette structure suite à l'évacuation instantanée de l'eau présente dans les particules à l'état gonflé. L'ARA initial (gélatinisé) est plutôt formé d'agrégats de particules de formes non définies. Cette structure est probablement causée par l'agglomération de particules d'ARA en réponse à la déshydratation exhaustive par l'acétone. Les particules hydrophiles se rapprochent ainsi lors d'un séchage ou d'une compression pour conserver leur eau d'hydratation, formant de ce fait un assemblage de granules. Pro préparée par lyophilisation est composée d'une structure poreuse constituée de feuillets interconnectés. L'ARA lyophilisé possède plutôt un réseau poreux et microporeux interconnecté alors que le mélange de Pro et ARA lyophilisé est formé de particules d'ARA microporeuses sur lesquelles des feuillets de Pro semblent adsorbés, suggérant une possible association physique entre les deux produits. La formation de structures lors du processus de congélation est due à la formation et la croissance de cristaux de glace, forçant les produits à s'auto-assembler au fil de l'augmentation de leur concentration dans les zones liquides (Zhang et Cooper, 2007). La

lyophilisation permet ensuite de retirer la glace par sublimation, laissant place à une structure déshydratée avec des pores où la glace était présente.

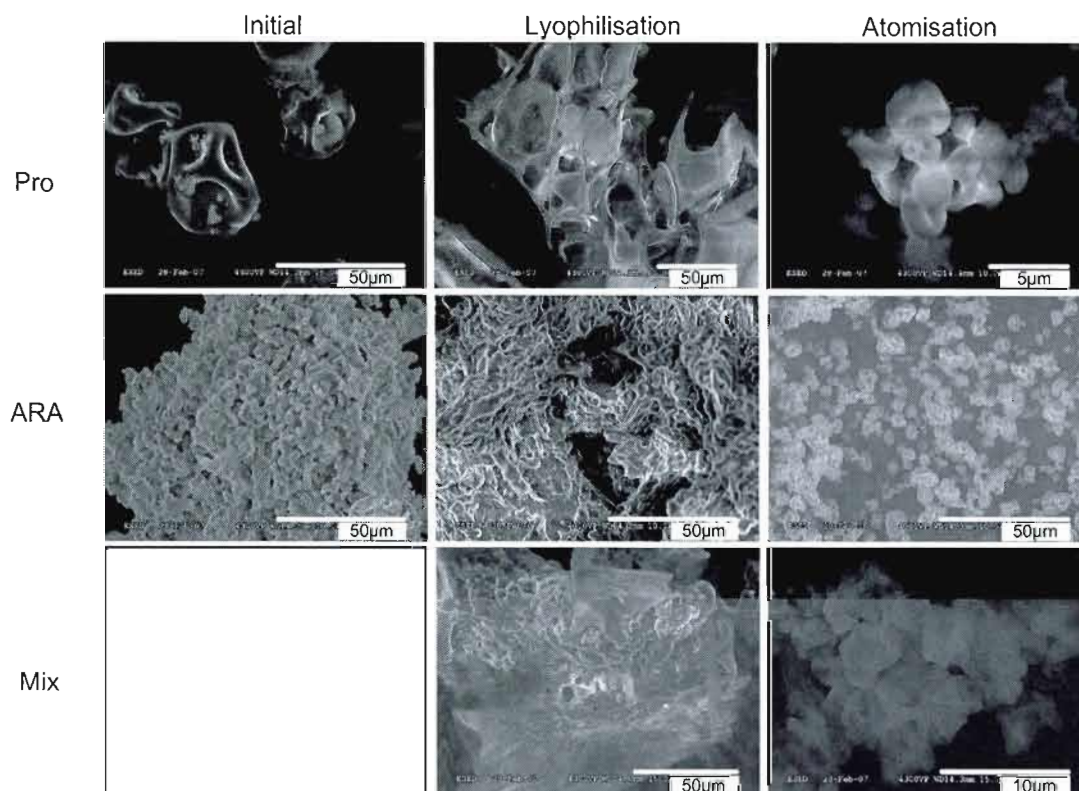


Figure 4.1 Images de MEB des particules d'excipients obtenues par les différentes méthodes de préparation et séchage.

Les densités des poudres avant et après tassement ont été mesurées afin de calculer leur indice de compressibilité (%) et le rapport de Hausner. Les valeurs obtenues (Tableau 4.1) donnent une approximation des propriétés d'écoulement des poudres et dépendent des interactions inter-particulaires. Les poudres possédant une grande différence entre leur densité avant et après tassement possèdent un indice de compressibilité et un rapport de Hausner élevé. Les particules ont alors beaucoup d'interactions entre elles et les propriétés d'écoulement sont considérées inadéquates. En effet, selon les normes USP24/NF19 portant

sur les propriétés d'écoulement des poudres, un rapport de Hausner supérieur à 1,25 est considéré comme limitant en industrie pharmaceutique. L'écoulement lent et irrégulier de ces poudres empêche la production efficace de comprimés en usine. Pour régler les problèmes d'écoulement des poudres, il est possible d'ajouter certains produits lubrifiants ou anti-statiques, tel le stéarate de magnésium (Weber, Pu et Cooney, 2008) ou le CAB-O-SIL®.

Tableau 4.1 Densité avant et après tassage, indice de compressibilité et rapport de Hausner des différents excipients

Produit	Densité <i>Bulk</i> (g/mL)	Densité après tassage (g/mL)	Indice de compressibilité (%)	Rapport de Hausner
Pro initial	0.135	0.310	56.52	2.30
Pro lyo	0.235	0.505	53.49	2.15
Pro at	0.157	0.336	53.33	2.14
ARA initial	0.250	0.398	37.21	1.59
ARA lyo	0.395	0.550	28.21	1.39
ARA at	0.335	0.683	51.02	2.04
Mix mec	0.244	0.389	37.21	1.59
Mix lyo	0.269	0.515	47.73	1.91
Mix at	0.231	0.473	51.11	2.05

Dans notre étude, les rapports de Hausner obtenus étaient tous au dessus du seuil acceptable, avec la valeur la plus faible de 1,39 étant attribuée à l'ARA lyo. Il est cependant intéressant de remarquer que le mélange mécanique entre Pro et ARA initial donne la même valeur que l'ARA initial, démontrant qu'il est possible de favoriser les propriétés d'écoulement en utilisant l'ARA initial comme additif. Les produits atomisés et tous les excipients constitués de Pro seule possèdent les rapports de Hausner les plus élevés, ce qui peut être dû à la faible taille des particules (10 μm et moins) dans le cas des produits atomisés, et/ou à l'augmentation des interactions entre les particules dans le cas des protéines. En effet, les protéines possédant des charges partielles à leur surface peuvent présenter des

problèmes d'écoulement causés par l'électricité statique, d'où la nécessité d'utiliser des produits lubrifiants ou anti-statiques dans les formulations.

La solubilité en milieu aqueux des protéines des excipients a été évaluée en vue de mieux comprendre les processus impliqués dans la libération du traceur lors des tests de dissolution. La Figure 4.2 montre que les protéines atomisées sont légèrement plus solubles que les Pro initiales et lyophilisées. Ce résultat suggère que le flux de chaleur généré par l'atomisation ne semble pas avoir causé une agrégation des protéines diminuant leur solubilité.

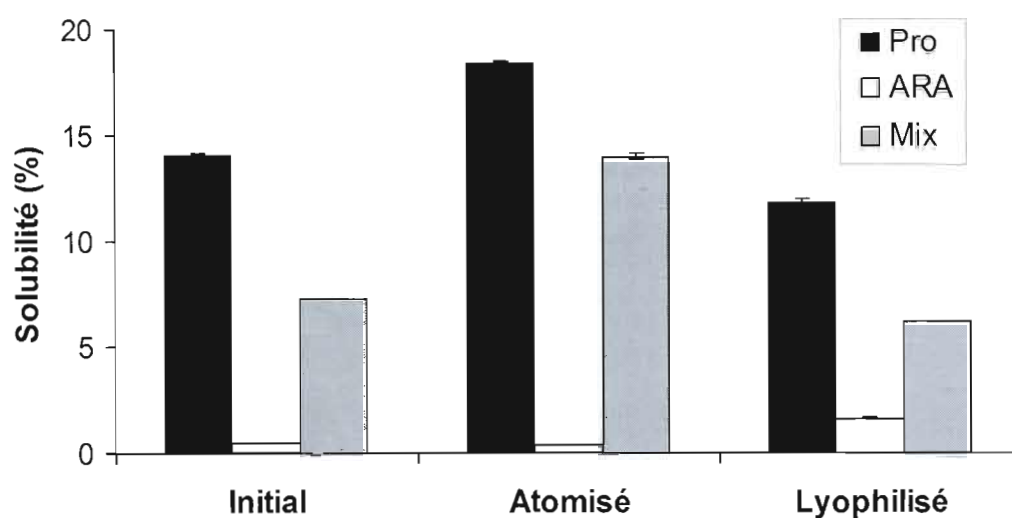


Figure 4.2 Pourcentage de solubilité des excipients en fonction des méthodes de préparation.

La plus grande solubilité des produits atomisés par rapport aux produits lyophilisés peut être due à la morphologie des particules. Des particules de petites tailles et ridées, telles celles préparées par atomisation, possèdent une grande surface et seront solubilisées plus facilement que des particules de tailles plus grandes et sous forme de feuillets, comme celle des protéines lyophilisées. Dans le cas des mélanges, on remarque que la solubilité a diminué

environ de moitié par rapport aux protéines seules. Il est cependant important de noter que les mélanges effectués étaient de 1:1 de Pro et ARA et que la méthode utilisée était celle de Bradford, donc spécifique aux protéines. Il en ressort donc que la solubilité des protéines est la même pour Pro seule que pour Pro en mélange lors d'une préparation par lyophilisation ou par mélange mécanique. Dans le cas du mélange atomisé, la différence entre Mix et Pro peut être due à des échantillons dont la répartition statistique entre ARA et Pro n'est pas précisément de 1:1 suite à l'atomisation. Il est aussi à constater que l'ARA seul utilisé comme témoin réagit légèrement avec le réactif de Bradford et peut générer une erreur dans la mesure.

Le pourcentage d'eau contenu dans un échantillon (humidité) peut renseigner sur l'hygroscopicité de l'excipient et influencer plusieurs facteurs tels la dureté des comprimés, la stabilité à long terme des formulations, les propriétés d'écoulement des poudres ou les propriétés de libération de traceurs. Le Tableau 4.2 énumère les quantités d'eau retrouvées dans les différents échantillons lors d'un équilibre à l'air ambiant (total), dans une étuve sous vide (liée) et la différence entre les deux (eau libre). L'ARA initial est celui contenant le plus grand pourcentage d'eau libre et étant le plus hygroscopique et est suivi de l'ARA atomisé. L'ARA ne possédant pas de charges ioniques, il lie peu d'eau de façon irréversible comparativement aux protéines hautement chargées de par leur composition en acides aminés tel l'aspartate et le glutamate possédant des groupements carboxylates. Il est à noter que dans tous les cas, les valeurs d'eau totale et liée les plus faibles sont celles des produits lyophilisés. Il est suggéré que ces produits ont eu la possibilité de réorganiser leurs chaînes (peptidiques ou glucosidiques) lors de la congélation, et ensuite de perdre le maximum de contenu en eau lors de la lyophilisation sans possibilité de réhydratation.

Tableau 4.2 Pourcentage massique d'eau totale, liée et libre dans les différents excipients

Échantillon	Contenu en eau (% m/m)		
	total	liée	libre
Pro initial	6,4	3,4	3,0
Pro at	7,0	3,4	3,6
Pro lyo	3,9	2,8	1,1
ARA initial	11,1	1,7	9,4
ARA at	8,3	0,9	7,4
ARA lyo	3,0	1,9	1,1
Mix mec	8,6	1,3	7,3
Mix at	6,4	2,1	4,3
Mix lyo	3,2	2,2	1,0

La dureté des comprimés permet de mesurer la résistance de ces derniers lors de l'application d'une contrainte mécanique. Des comprimés fragiles pourraient se désintégrer lors de leur transport tandis que des comprimés trop rigides pourraient passer à travers le tractus gastro-intestinal sans libérer le principe actif. Cette mesure peut aussi renseigner sur les possibles interactions cohésives ou répulsives entre les différentes particules formant l'excipient dans sa forme non-hydratée. La Figure 4.3 présente les valeurs obtenues pour les comprimés préparés à partir des différentes poudres. Dans le cas des produits initiaux et lyophilisés, les comprimés d'ARA seul sont les plus solides et ceux de Pro sont les plus fragiles. Les mélanges mécaniques et lyophilisés affichent des valeurs médianes entre Pro et ARA, suggérant qu'il n'y a pas d'association supplémentaire entre les poudres lors de la compression pour le moulage en comprimés. La dureté des comprimés Mix atomisés est cependant plus faible que celles obtenues pour ARA et Pro atomisés seuls. Ce résultat suppose, tel qu'énoncé dans les résultats de solubilité des protéines, que les composantes du mélange atomisé sont statistiquement moins bien réparties que dans le cas du mélange mécanique et lyophilisé.

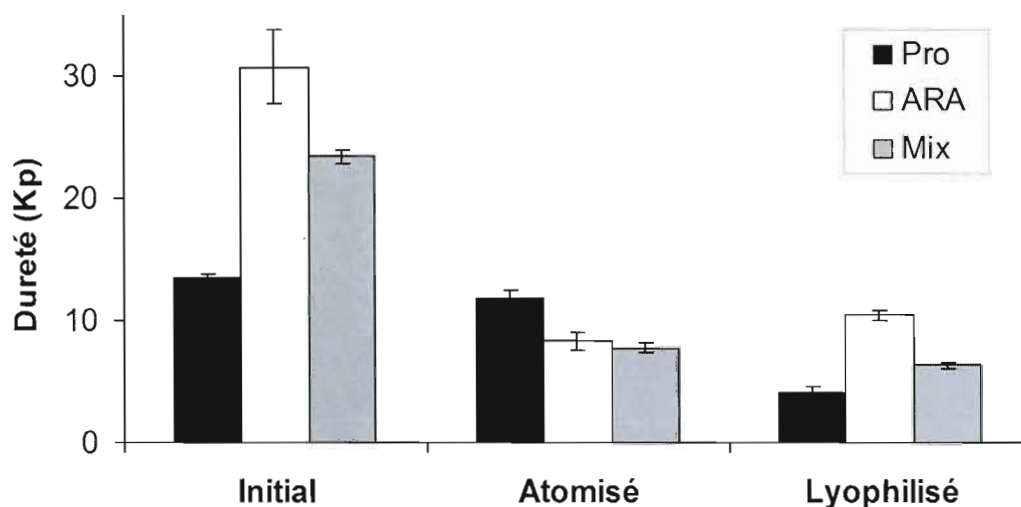


Figure 4.3 Dureté des comprimés préparés par compression des différents excipients sans actif.

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la dureté des comprimés, notamment la taille et la morphologie des particules, le contenu en eau adsorbée, la force de compression, etc. Dans cette étude, il est probable que les différences observées soient attribuables en majorité aux morphologies et tailles de particules variables d'un excipient à l'autre en fonction de la méthode de séchage. Ainsi, les particules de petites tailles et ridées obtenues par atomisation mènent à des comprimés fragiles comparativement à l'ARA initial possédant des macrostructures de particules agglomérées. Il en est de même pour les structures en réseau interconnectés microporeuses et en feuillets obtenues lors du processus de congélation-lyophilisation qui peuvent laisser des espaces vides et ainsi fragiliser les comprimés.

Les profils de libération d'un traceur, l'hydroxyquinoline (HQN), dans les milieux gastrique et intestinal simulés ont été établis en présence et en absence d'enzymes digestives et sont présentés à la Figure 4.4.

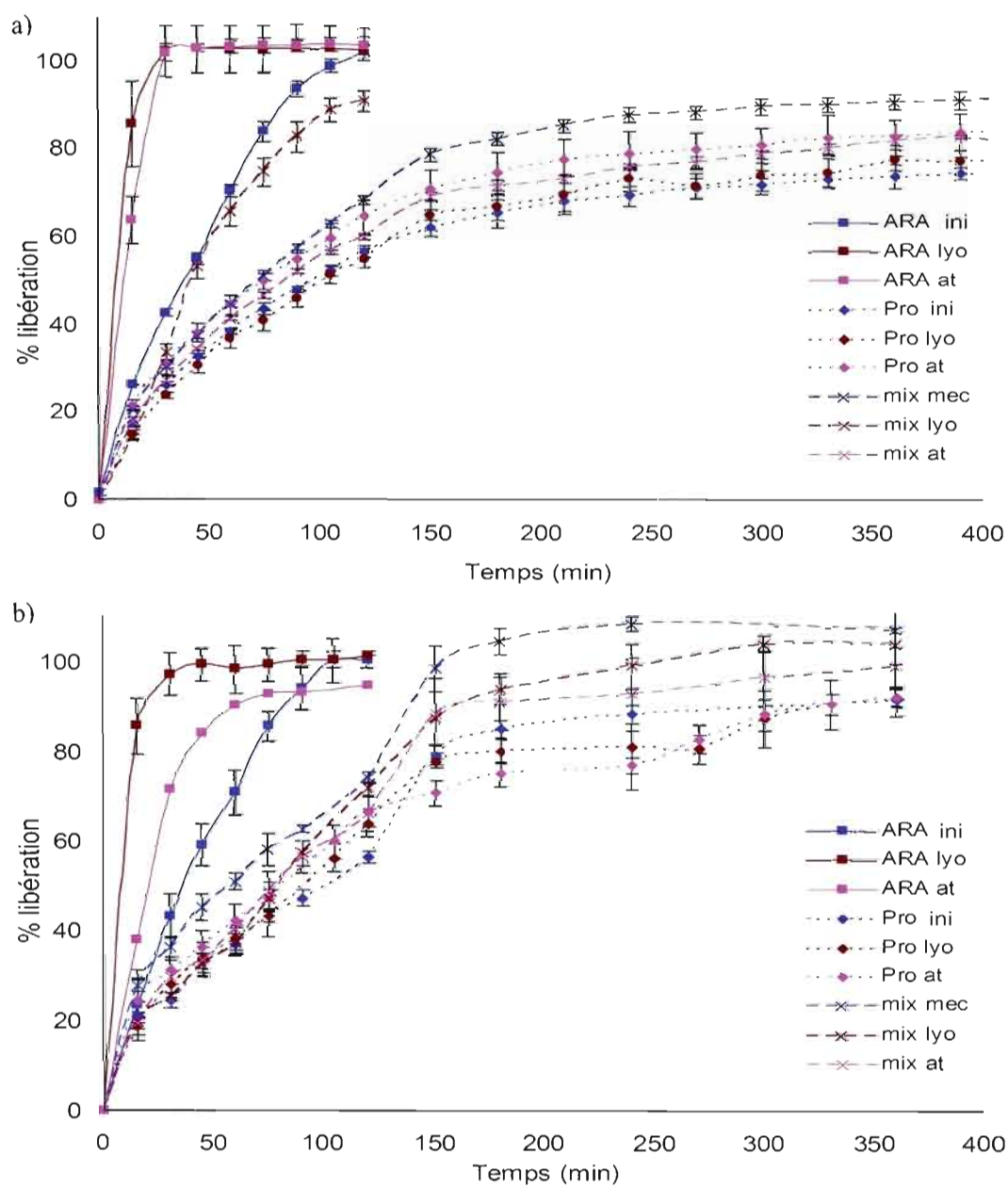


Figure 4.4 Profils de libération de HQN dans le SGF (2h) et SIF a) en absence d'enzyme et b) en présence d'enzymes digestives.

Les comprimés à base d'ARA atomisé et d'ARA lyophilisé ont libéré le traceur dans le SGF en moins de 60 min avec ou sans enzyme. Les comprimés d'ARA initial ont quant à eux libéré le traceur en environ 120 min. Cette libération rapide du traceur était attendue puisque les comprimés d'ARA seuls ont tendance à faire du *caping*, soit à se fracturer lors de l'hydratation rapide du comprimé par rapport à la relaxation du polymère. L'hydratation rapide de ces comprimés est causée par la porosité des particules observée par SEM. L'ARA lyo était plutôt de type désintégrant, soit effectuant une rupture instantanée lors de son contact avec le SGF. Ce comportement peut être corrélé à la faible cohésion des particules entre elles et aux microporosités observées par SEM.

Les seconds excipients libérant le plus rapidement sont les Mix mécaniques et Mix lyophilisés. Les comprimés de Mix lyophilisés étant très fragiles dans les fluides digestifs simulés, il fallait les manipuler avec grand soin afin qu'ils ne se désintègrent pas lors du passage du SGF vers le SIF. Il est ainsi supposé que ces comprimés se désintègreraient sous l'effet du péristaltisme. Dans le cas du Mix mécanique, les comprimés ont libérés environ 70 % du traceur en 120 min (SGF). L'ajout de Pro initial dans la formulation a eu un effet marqué sur la vitesse de libération de HQN par rapport l'utilisation d'ARA initial seul, enrayant l'effet de *caping* et permettant une libération plus lente. Le Mix atomisé a libéré l'HQN sensiblement comme Pro seule mais tel que discuté plus tôt, il est probable que le ratio ARA:Pro ne soit pas de 1:1 donc la quantité de protéines présente dans les comprimés plus élevée que supposée. Dans tous les cas, les excipients libérant le plus lentement étaient ceux de Pro. Entre 60 et 40 % de l'HQN totale a été libérée dans les 120 minutes passées dans le SGF avec ou sans pepsine. Lors du passage au SIF sans pancréatine, la libération est devenue plus lente que dans le SGF. Il semble donc que les protéines de soja agissent comme agent liant dans les formulations en formant une matrice stable dans les fluides digestifs simulés. Ceci permet une libération du traceur contrôlée par diffusion plutôt que par érosion enzymatique, tout en conservant l'intégrité des comprimés.

En présence de pancréatine, la libération dans le SIF semble légèrement plus rapide que sans enzyme car le processus de libération est non seulement conduit par la diffusion du traceur vers l'extérieur des comprimés hydratés, mais aussi par l'érosion causée par les

enzymes pancréatiques (Trypsine et Chymotrypsine au niveau de Pro et α -amylase au niveau de l'ARA). Bien que les comprimés récupérés à la fin des tests de dissolution fussent plus érodés en présence qu'en absence d'enzyme, il est difficile d'affirmer à ce point si la mince différence de cinétique de libération observée est réellement due au mécanisme d'érosion des enzymes. Des tests avec des quantités d'enzymes plus élevées permettraient de valider la différence de libération en présence et absence d'enzyme d'une façon plus significative. Aussi, l'utilisation de comprimés de différentes tailles et avec différentes quantités de traceurs permettrait de cibler les différences entre les mécanismes de diffusion et d'érosion impliqués dans la libération du principe actif. Dans tous les cas, la dureté des comprimés, la quantité d'eau dans les excipients et la solubilité des protéines ne semblent pas en lien direct avec les cinétiques de libération. Il en est de même pour un bon nombre de formulations pharmaceutiques dans lesquelles les propriétés physiques et chimiques mesurables des différents excipients les constituant ne sont pas corrélées aux cinétiques de libération du principe actif, mais plutôt à leur comportement lors de l'hydratation dans les milieux digestifs simulés. Dans notre cas, la vitesse de libération semble plutôt dépendre de la capacité des excipients à s'hydrater ou à se dégrader et à permettre au traceur de passer vers les fluides gastrique et intestinaux simulés.

4.5 Conclusion

Le domaine pharmaceutique est en recherche constante de formulations à libération contrôlée versatiles permettant d'améliorer l'action des médicaments et le confort des patients. Il était donc d'intérêt d'étudier le potentiel de produits biologiques sans danger tels les protéines de soja et l'amidon riche en amylose pour la conception de systèmes de libération d'agents bioactifs. Les différentes méthodes de séchages des excipients Pro et ARA ont mené vers des morphologies de particules différentes. Les particules d'ARA atomisées étaient petites et ridées alors que l'ARA lyophilisé était plutôt formé d'un réseau interconnecté microporeux. Les particules de Pro atomisée avaient aussi un aspect physique ridé alors que la Pro lyophilisée était formée d'une structure poreuse avec des feuillets interconnectés. Les rapports de Hausner des poudres étaient tous au dessus de la limite de 1,25 recommandée par les industries, montrant que les propriétés d'écoulement de ces

excipients utilisés tels quels ne sont pas adéquates. Les quantités d'eau adsorbée par l'ARA initial et atomisé étaient les plus élevées, Pro initial et atomisé suivant au deuxième rang. Les poudres lyophilisées étaient celles avec le plus faible contenu en eau adsorbée totale et libre. La dureté des comprimés était plus grande pour les produits initiaux tandis que les valeurs étaient similaires pour les produits atomisés et lyophilisés, ce qui peut être attribué en partie à la taille, la morphologie et le contenu en eau des particules. Finalement, il a été constaté que Pro semble lier l'ARA lors d'un mélange, donnant une libération intermédiaire entre l'ARA seul et Pro seule. Dans tous les cas, les comprimés libérant le traceur le plus lentement étaient ceux de Pro seule, même si ces derniers étaient érodés lorsque placés dans le SGF et SIF en présence des enzymes digestives respectives. Il est donc possible de conclure que l'association de l'ARA et Pro telle qu'effectuée dans cette étude n'est pas idéale pour la formation d'un excipient à libération contrôlée. Toutefois, bien que les résultats de libération de HQN aient montré que l'ajout d'ARA gélatinisé n'améliore pas le comportement de l'isolat de protéines de soja Pro, l'ajout de Pro semble plutôt améliorer les propriétés de l'ARA gélatinisé comme excipient. Les protéines de soja ajoutées aux formulations d'ARA semblent favoriser la cohésion des particules en milieux digestifs simulés, présentant un potentiel d'additif liant dans les formulations. Ainsi, nous avons par la suite abordé les protéines de soie, ces dernières étant connues pour leurs propriétés associatives et liantes avec divers polymères (Chapitre III).

CHAPITRE V

DISCUSSIONS, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les biomatériaux de type matrices 3D occupent une place importante en ingénierie tissulaire. Les avancées dans la connaissance des besoins en matière de biocompatibilité, de biodurabilité et de morphologie de ces matériaux pour l'obtention de cultures cellulaires viables ont mené au développement de techniques diverses pour optimiser leur production. Afin de permettre la pénétration, l'organisation, la différenciation et le transport des nutriments et déchets, la morphologie doit généralement être constituée d'un réseau poreux interconnecté. La nature des matières premières utilisées dans la conception de ces matériaux peut être judicieusement choisie afin de rencontrer plusieurs des critères nécessaires à leur bon fonctionnement dans l'application finale visée.

La fibroïne de soie étant une protéine reconnue pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et ses propriétés mécaniques exceptionnelles, son utilisation pour la production de matrices 3D poreuses a été préconisée dans ce projet de recherche. L'ajout de NaCl en conditions saturantes à des solutions de fibroïnes et le processus de congélation-lyophilisation sont des méthodes connues pour produire des matrices 3D à base de fibroïne. L'ajout de sel en conditions saturantes permet d'induire la formation d'une structure moléculaire en feuillets β tandis que la congélation préalable à la lyophilisation offre la possibilité de varier l'aspect morphologique final des matrices 3D en contrôlant partiellement le processus de formation et de croissance des cristaux de glace. Le but du projet de recherche principal développé dans ce mémoire consistait à étudier les répercussions de l'ajout de sel dans des solutions de fibroïne combiné à l'effet d'un changement du régime de

congélation sur la morphologie, les propriétés mécaniques et la structure moléculaire finale de matrices 3D préparées par congélation-lyophilisation. La fonctionnalité des biomatériaux à base de fibroïne de soie pour utilisation en tant que support pour culture cellulaire a aussi été confirmée.

L'étude de la morphologie des matériaux par MEB a révélé un réseau de fibroïne poreux et interconnecté lors d'une congélation lente à -22°C , et une structure en feuillets orientés lors d'une congélation rapide à -73°C . L'ajout de NaCl (0-250 mM) lors de la préparation des matrices à -22°C a conduit vers un réseau encore plus poreux et interconnecté alors que la confection par congélation rapide à -73°C a eu comme répercussion de créer des micropores à la surface de feuillets de fibroïne en plus de favoriser l'apparition de filaments sphéroïdes à la surface de ces derniers. Aux deux températures de congélation, le ratio de gonflement des matrices était plus élevé et les propriétés mécaniques plus faibles lors de l'ajout de sel. Les différences morphologiques des matrices lyophilisées ont été attribuées aux variations dans les processus de nucléation et de croissance des cristaux de glace lors de la congélation. La congélation rapide à -73°C permettrait la formation de cristaux de glace avec une croissance orientée, alors qu'elle permettrait plutôt une nucléation statistiquement mieux répartie dans l'échantillon lors d'une congélation lente à -22°C . L'ajout de sel semblerait plutôt perturber le système en créant des zones à l'interface liquide-solide riches en sel avec l'avancement de la congélation.

L'étude de l'arrangement moléculaire des matériaux par FTIR et XRD a révélé un changement de la structure secondaire de la fibroïne lors d'un traitement au méthanol, passant d'un mélange d'hélices α et de structures aléatoires dynamiques, vers une structure majoritairement en feuillets β . Aucune différence significative n'a cependant été détectée lors de l'ajout de sel ou du changement de la température de congélation. Finalement, la compatibilité des biomatériaux pour la culture de cellules P19 a été démontrée grâce à la microscopie confocale à balayage laser. Les images ont permis de déterminer que la majorité des cellules étaient viables dans tous les échantillons testés et pénétraient la plupart des matrices pour s'organiser en agrégats. Cette organisation de cellules P19 en agrégats étant un facteur requis à leur différenciation en divers types cellulaires, il est maintenant envisageable

d'effectuer des études plus poussées sur les interactions cellules-matrices et les différentes possibilités d'induire la formation de tissus.

La structure en feuillets orientés des matrices 3D préparées dans le projet pourrait servir d'assise à la formation de réseaux neuronal linéaires ou encore de soutien pour cardiomyocytes afin d'étudier la synchronisation entre les cellules lors de leur organisation. D'autre part, il existe aussi un besoin de produire des supports à culture cellulaire pour la formation de tumeurs 3D, permettant alors de vérifier *in vitro* l'effet d'agents antinéoplasiques sur ces dernières (Hartman *et al.*, 2009).

Les besoins croissants d'adapter la morphologie de matrices 3D pour des applications en tant que support à culture cellulaire ou pour l'ingénierie tissulaire ouvrent la voie au développement de méthodes versatiles dans la production de ces biomatériaux. Les différents types de cellules, de tissus ou d'organes justifient les besoins d'explorer différentes voies de préparation des matrices 3D. L'étude présentée a montré la possibilité d'adapter la morphologie des matériaux lyophilisés pour une utilisation comme support pour culture cellulaire, et ce, en modifiant simultanément la température de congélation et l'ajout de NaCl dans les solutions avant la congélation. Des études de différenciation et d'organisation des cellules pourraient finalement être conduites ultérieurement en utilisant ce type de biomatériaux. Aussi, il serait possible d'améliorer le travail effectué en étudiant d'autres températures de congélation, en ajoutant d'autres types de sel ou en mélangeant d'autres polymères à la fibroïne afin d'étendre cette étude et de permettre une application généralisée des phénomènes observés.

Le second projet de recherche présenté dans ce mémoire a permis d'évaluer le potentiel d'utilisation d'un isolat de protéines de soja mélangé à l'amidon riche en amylose (ARA) pour la production d'un excipient pharmaceutique visant la libération de molécules actives par voie orale. Puisque plus de 30% des acides aminés des protéines de soja sont constitués d'acide aspartique et glutamique, il était supposé que ces protéines puissent agir tel un tampon lors de leur contact avec le milieu gastrique acide. De l'autre côté, il était estimé que l'ARA possède la capacité de moduler la

libération de molécules actives par stabilisation à l'aide de ponts hydrogènes inter et intra-chaînes. Le but de ce projet était ainsi d'évaluer le potentiel d'un excipient à base d'isolat de protéines de soja, la Prolisse (Pro), mélangé avec de l'ARA gélatinisé pour la libération contrôlée de principes actifs par voie orale. L'hypothèse de départ supposait une possible stabilisation des formulations monolithiques par des interactions intermoléculaires favorables entre le polysaccharide et l'isolat de protéine utilisé.

Les méthodes de préparation des excipients composés ont été variées afin de déterminer s'il était possible d'obtenir une co-stabilisation des formulations lors d'un mélange de poudres préalable à une compression directe dans un moule pour former des comprimés. Les processus de préparation des excipients utilisés ont été le mélange mécanique des poudres de Pro et ARA et les mélanges en milieu aqueux suivi de co-séchages par congélation-lyophilisation ou atomisation pour obtenir des particules. Pro et ARA seuls ont aussi été préparés par les mêmes méthodes en tant que témoins pour comparaison.

Les différentes méthodes de séchages des excipients Pro et ARA ont mené vers des morphologies de particules différentes. Les particules d'ARA atomisées étaient petites et ridées alors que l'ARA lyophilisé était plutôt formé d'un réseau interconnecté microporeux. Les particules de Pro atomisée avaient aussi une morphologie ridée alors que la Pro lyophilisée était formée d'une structure poreuse avec des feuillets interconnectés. Les rapports de Hausner des poudres se situaient tous au dessus de la limite de 1,25 recommandée par les industries, montrant que les propriétés d'écoulement de ces excipients utilisés tels quels devraient être améliorées en ajoutant des produits anti-statiques ou lubrifiants. Les quantités d'eau adsorbée par l'ARA initial et atomisé étaient les plus élevées, Pro initial et atomisé suivant au deuxième rang. Les poudres lyophilisées étaient celles avec le plus faible contenu en eau adsorbée totale et libre. La dureté des comprimés était plus grande pour les

produits initiaux tandis que les valeurs étaient similaires pour les produits atomisés et lyophilisés, ce qui peut être attribué en partie à la taille, la morphologie et le contenu en eau des particules.

Il a été constaté que Pro semble lier l'ARA lors d'un mélange, menant vers une libération intermédiaire entre l'ARA seul et Pro seule. Dans tous les cas, les comprimés libérant le traceur le plus lentement étaient ceux de Pro seule, même si ces derniers étaient érodés lorsque placés dans le SGF et SIF en présence des enzymes digestives respectives. Il apparaît donc que l'association de l'ARA et Pro telle qu'effectuée dans cette étude n'est pas idéale pour la formation d'un excipient à libération contrôlée. Toutefois, même si les résultats de libération de HQN ont montré que l'ajout d'ARA gélatinisé n'améliore pas le comportement de l'isolat de protéines de soja Pro, l'ajout de Pro améliore les propriétés de l'ARA gélatinisé comme excipient pour la libération de molécules. Les protéines de soja ajoutées aux formulations d'ARA semblent favoriser la cohésion des particules en milieux digestifs simulés, présentant un potentiel d'additif liant dans les formulations. Dans tous les cas, la dureté des comprimés, la quantité d'eau dans les excipients et la solubilité des protéines ne semblaient pas montrer de corrélation directe avec les cinétiques de libération.

Enfin, même si les comprimés récupérés à la fin des tests de dissolution étaient plus érodés en présence qu'en absence d'enzyme, il est difficile d'affirmer à ce point si la faible différence de cinétique de libération observée était réellement due au mécanisme d'érosion des enzymes ou à une diffusion plus rapide du traceur vers les milieux digestifs simulés. Des tests avec des quantités d'enzymes plus élevées permettraient de valider la différence de libération en présence et absence d'enzyme d'une façon plus significative. Aussi, l'utilisation de comprimés de différentes tailles et avec différentes quantités de traceurs permettrait de cibler les différences entre les mécanismes de diffusion et d'érosion impliqués dans la libération du principe actif.

ANNEXE A

AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES EFFECTUÉES DANS LE CADRE DU STAGE DE MAÎTRISE

- A.1 Résumé soumis pour la participation au *Biophysical Society 53rd Annual meeting*
et affiche présentée au *Biophysical Society 53rd Annual Meeting* 90
- A.2 Article de vulgarisation portant sur les biomatériaux publié dans le bulletin
électronique science express de l'UQÀM en juin 2009..... 92
- A.3 Résumé soumis pour la participation au congrès de la Société Canadienne de
Biomatériaux de 2009..... 97

Effects Of Salt Concentration And Freezing Temperature On The Preparation Of Silk Fibroin Porous Scaffolds For Cell Culture Applications.

Frederic Byette¹, Mircea Alexandru Mateescu¹, Christian Pellerin², Isabelle Marcotte¹.

¹Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada, ²Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

Abstract: Silk fibroin extracted from *Bombyx mori* silkworm cocoons were shown useful in a wide range of applications including cell culture, bone regeneration and drug controlled release due to their impressive mechanical properties, biocompatibility and biodegradability. The aim of this work was to prepare silk fibroin scaffolds for cell culture applications. To do so, we have verified the effect of NaCl in fibroin solutions and of freezing temperature on the structure of the 3D porous materials. Fibroin solutions containing various NaCl concentrations (0.05-0.25M) were frozen at -70°C and -20°C prior to freeze-drying. The resulting materials were treated with methanol and washed with water to remove the salt. They were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, wide angle X-ray diffraction, porosity and density measurements. The SEM images show an interconnected network when the fibroin solution is frozen at -20°C, with porosity increasing with salt concentration. The scaffolds prepared at -70°C present a leaf-like structure with preferential orientation and the apparition of a definite microporosity when salt concentration is raised. The differences in the physical aspects of the materials at -20 and -70°C could be explained by the rates of water freezing. FTIR study of the amide I band reveals a change in secondary structure of the proteins from α -helix/random coil to a predominant β -sheet conformation after methanol treatment of the scaffolds. The FTIR results also indicate that there are no molecular changes induced by the presence of the salt or by the slow (-20°C) or fast (-70°C) freezing of the solutions. In conclusion, our study shows that the freezing temperature and addition of NaCl may be varied to optimize the scaffolds structure for use as cell culture support.

Les Biomatériaux : Rôles et Stratégies

Frédéric Byette, B.Sc., Département de Chimie, UQÀM

La définition de biomatériaux est longtemps restée ambiguë, la problématique étant de trouver un terrain d'entente sur les composants et les caractéristiques de cette classe de matériaux en lien avec leur dénomination. Par exemple, lorsque les mots biochimie ou biophysique sont utilisés, ils font références à l'étude de systèmes biologiques, tandis que le mot biomatériau fait référence à des matériaux tant naturels que synthétiques, dont l'application se situe au niveau d'un système biologique. Dans ce cas précis, le préfixe *bio* ne fait donc pas référence à la nature des matériaux mais bien aux applications auxquelles ils sont désignés. Dans ce contexte, un biomatériau peut avoir des applications tant en médecine, lorsqu'utilisé en matériaux implantables par exemple, qu'en biologie lorsqu'utilisé pour la culture cellulaire *in-vitro*.

Les premiers biomatériaux sous forme d'implants étaient conçus pour remplacer une fonction spécifique, le plus souvent mécanique, et étaient considérés idéaux s'ils ne provoquaient peu ou pas de réponses indésirables, telles des inflammations ou des réactions allergiques, dans les systèmes biologiques³. Les matériaux étaient constitués de substances inertes comme le Teflon® dans le cas d'implants vasculaires, ou de métaux non-oxydables dans le cas de réparations de fractures osseuses. Les propriétés mécaniques et la biocompatibilité satisfaisaient les besoins mais certains problèmes subsistaient, tels des thromboses dans le cas des implants vasculaires ou des affaiblissements des os dans le cas des implants orthopédiques.

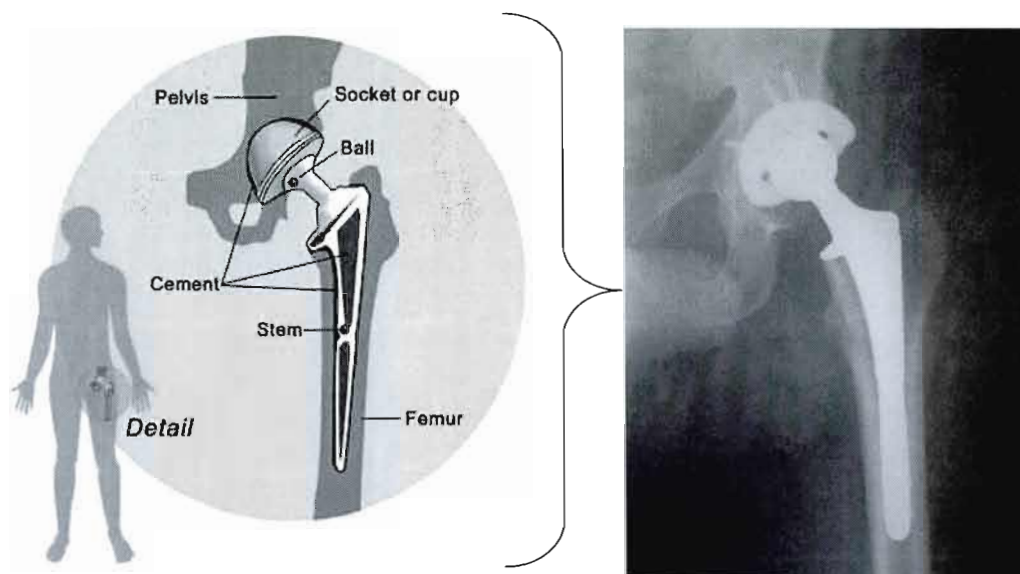


Figure 1 : Détails d'une prothèse implantable utilisée dans les cas de reconstruction d'une hanche. À gauche, représentation schématique¹; à droite, radiographie après chirurgie².

De nos jours, le biomatériau idéal, en plus de remplir la fonction désirée, devrait éventuellement se résorber ou se dégrader pour être remplacé par le tissu naturel³. Le défi est grand afin de rencontrer ces conditions car, en plus d'être biocompatible, biodégradable et posséder les propriétés mécaniques adéquates, la cinétique de dégradation doit être constante et suivre celle de formation des tissus. Dans le meilleur des cas, le matériau doit être bioactif, soit favoriser la croissance des tissus naturels à l'intérieur ou à la surface de ce dernier. Afin de satisfaire ces critères, certains biomatériaux peuvent contenir des facteurs de croissances ou autres molécules thérapeutiques afin de favoriser la croissance des cellules ou empêcher les infections ou réactions inflammatoires au site d'implantation. De plus, il est important de prendre en considération les interactions entre le ou les matériaux et les tissus au site d'implantation, tout en s'assurant que les espèces libérées lors de la dégradation du biomatériau sont métabolisables.

Il devient donc évident que le développement de biomatériaux est un domaine multidisciplinaire puisqu'il est primordial de posséder des connaissances sur les tissus et/ou fonctions biologiques, les biomatériaux et enfin les interactions possibles entre ces derniers dans le système biologique étudié. Le développement de ces produits fait alors appel à des expertises en biologie, biochimie, biophysique, médecine, chimie et science des matériaux, le tout sur une base d'ingénierie, afin de rencontrer les objectifs le plus efficacement possible.

La composition des biomatériaux varie en fonction des besoins du domaine d'application. Les classes les plus répandues sont les biopolymères, naturels ou synthétiques, les biocéramiques et les composites, soit un agencement de deux ou plusieurs matériaux⁴. Les avancées dans la compréhension des systèmes biologiques au niveau tissulaire, cellulaire et moléculaire permettent de développer des biomatériaux de plus en plus sophistiqués. Ces matériaux doivent répondre à des critères de biocompatibilité en plus de posséder un aspect physique et des propriétés mécaniques en fonction de l'utilisation prescrite. Aussi, ces matériaux peuvent être bioactif, tel que mentionné plus tôt, ou encore être bioinerte, biorésorbable ou biodégradable afin de remplir leurs rôles. Un matériau bioinerte n'est pas toxique lorsqu'implanté dans un système *in-vivo* et ne se décompose pas, ou peu, avec le temps. Un matériau biorésorbable se décompose par phénomènes chimiques, tel l'hydrolyse ou l'oxydation, tandis qu'un matériau biodégradable se dégrade sous l'action des enzymes lorsqu'implanté dans un système biologique.

D'autre part, les chimistes des matériaux connaissant mieux les nécessités du domaine biomédical peuvent développer et optimiser plus rapidement des biomatériaux en utilisant des produits dont certaines caractéristiques de départ sont bien connues et complaisent aux applications. Par exemple, pour la reconstruction osseuse, des matériaux poreux avec des propriétés mécaniques semblables à celles des os peuvent être développés afin de mimer la structure des tissus osseux tout en favorisant la migration cellulaire vers l'intérieur des implants. Le tableau 1 affiche différents types de matériaux et leurs applications dans différents domaines.

Des recherches effectuées dans le laboratoire du Pr. Mateescu, en collaboration avec Isabelle Marcotte (UQÀM) et Christian Pellerin (Université de Montréal), visent le développement d'un biomatériau à partir d'une protéine déjà connue pour sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et ses propriétés mécaniques exceptionnelles, la fibroïne de soie. Cette protéine est extraite des fibres des cocons de ver à soie *Bombyx mori* (le Bombyx du mûrier), puis portée en solution avant d'être régénérée en treillis tridimensionnels (3-D *scaffolds*) ayant l'aspect d'éponges tel qu'illustré à la figure 2b. Les fibres de soie doivent subir un processus de nettoyage afin d'enlever une gaine de sérécine, une protéine indésirable

dû à son caractère allergène. La morphologie des biomatériaux est modifiée pour une optimisation à des fins d'utilisation comme support lors de cultures cellulaires.

Les cellules cultivées dans les treillis tridimensionnels, des cellules souches embryonnaires non différenciées, pourront finalement être transformées en un type cellulaire spécifique dans des travaux futurs, et les biomatériaux résultant pourraient être utilisés dans une optique d'ingénierie tissulaire.

Tableau 1 : Types de matériaux utilisés en fonction de différentes applications⁵.

Application	Types of materials
Skeletal system	
Joint replacements (hip, knee)	Titanium, Ti-Al-V alloy, Stainless steel, polyethylene
Bone plate for fracture fixation	Stainless steel, cobalt-chromium alloy
Bone cement	Poly(methyl methacrylate)
Bony defect repair	Hydroxyapatite
Artificial tendon and ligament	Teflon, Dacron
Dental implantation	Titanium, Ti-Al-V alloy, Stainless steel, polyethylene Titanium, alumina, calcium
Cardiovascular system	
Blood vessel prosthesis	Dacron, Teflon, polyurethane
Heart valve	Reprocessed tissue, stainless steel, carbon
Catheter	Silicone rubber, Teflon, polyurethane
Organs	
Artificial Heart	Polyurethane
Skin repair template	Silicone-collagen composite
Artificial kidney (hemodialyzer)	Cellulose, polyacrylonitrile
Heart-lung machine	Silicone rubber
Senses	
Cochlear replacement	Platinum electrodes
Intraocular lens	Poly(methyl methacrylate), silicone rubber, hydrogel
Contact lens	Silicone-acrylate, hydrogel
Corneal bandage	Collagen, hydrogel



Figure 2 : a) Ver à soie produisant son cocon⁶ et b) Treillis tridimensionnels préparés en laboratoire

Références

- 1- <http://dspace.mit.edu>
- 2- <http://www.bjc-houston.com>
- 3- Park J.B., 1984, *Biomaterials science and engineering*, Plenum press, New-York, 459p.
- 4- Kutz M., 2003, *Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design*, McGraw-Hill, New-York, 1500p.
- 5- Ratner B. et al., 2004, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier, 864p.
- 6- Voet, D. et Voet J.G., 1990, *Biochemistry*, John Wiley and Sons, New-York, 1223p.

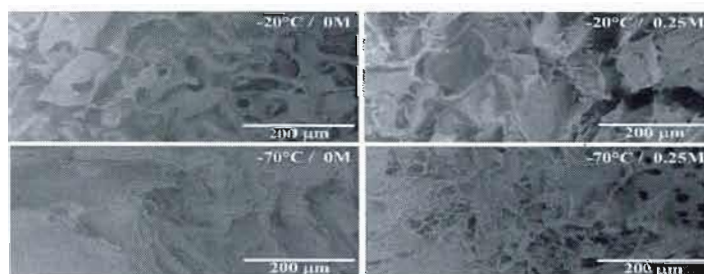
MODIFICATION OF SILK FIBROIN SCAFFOLDS STRUCTURE INDUCED BY CHANGES IN NaCl CONCENTRATION AND FREEZING TEMPERATURE

Frédéric Byette¹ (M.Sc. student), Isabelle Marcotte¹, Christian Pellerin² and Mircea Alexandru Mateescu¹

Department of chemistry & PharmaQAM center, Université du Québec à Montréal¹,
Department of chemistry, Université de Montréal², Montreal (Quebec), Canada

The aim of this work was to elaborate a new preparation procedure of silk fibroin scaffolds for cell culture applications. To do so, a special attention was paid to the effect of NaCl in fibroin solutions and of freezing temperature on the structure of 3D porous materials prepared by freeze-drying. Silk cocoons were washed by boiling in Na₂CO₃ (0.02M) in order to eliminate sericin glue-like protein. Degummed silk fibers were then dissolved in a concentrated LiBr solution (9.3M) and the solution was filtered and dialyzed against distilled water three days to remove the salt. The final concentration (3.0% wt) was evaluated by weighing the remaining solid after drying. Then, fibroin solutions supplemented with various NaCl concentrations (0.05-0.25M) were frozen at -70°C and -20°C prior to freeze-drying. The resulting porous materials were treated with methanol overnight to induce their water insolubility and washed with distilled water to remove the salt. They were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, wide angle X-ray diffraction, porosity and density measurements.

Fig.1. SEM micrographs of fibroin scaffolds frozen at -20 and -70°C, untreated and treated with 0,25M NaCl



The SEM images (Fig.1) show an interconnected network when the fibroin solution was frozen at -20°C, with porosity increasing with salt concentration. The scaffolds prepared at -70°C present a leaf-like structure with preferential orientation and, interestingly, the apparition of microporosity when salt concentration is raised. At high salt concentration, a network within oriented leaf-like structure was observed. The differences in the physical aspects of the materials at -20 and -70°C could be explained by the rates of water freezing. FTIR study of the amide I band clearly reveals a change in secondary structure of the proteins from α -helix/random coil to a predominant β -sheet conformation induced by methanol treatment of the scaffolds. The FTIR results also indicate that there are no molecular changes induced by NaCl or by the slow (-20°C) or fast (-70°C) freezing of the solutions. In conclusion, our study shows that the freezing temperature and addition of NaCl may be varied to optimize physical aspects of scaffolds, but preserving the molecular characteristics. The prepared porous materials will further be tested as support for cell growth.

RÉFÉRENCES

- Agrawal, C. M. et R. B. Ray (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* **55**, p. 141-150.
- Allain, A.-F., P. Paquin et M. Subirade (1999). Relationships between conformation of [beta]-lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* **26**, p. 337-344.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond et D. L. Kaplan (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials* **24**, p. 401-416.
- Altman, G. H., R. L. Horan, H. H. Lu, J. Moreau, I. Martin, J. C. Richmond et D. L. Kaplan (2002). Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* **23**, p. 4131-4141.
- Anderson, J. M., G. Cook, B. Costerton, S. R. Hanson, A. Hensten-Pettersen, N. J. Jacobsen, Richard J. et R. N. P. Mitchell, Mark; Schoen, Frederick J.; Shirtliff, Mark; Stoodley, Paul (2004). Host Reactions to Materials and Their Evaluation. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 294-354.
- Angello, J. C., S. Kaestner, R. E. Welikson, J. N. Buskin et S. D. Hauschka (2006). BMP induction of cardiogenesis in P19 cells requires prior cell-cell interaction(s). *Developmental Dynamics* **235**, p. 2122-33.
- Arnold, A. A. et I. Marcotte (2009). Studying natural structural protein fibers by solid-state nuclear magnetic resonance. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **34A**, p. 24-47.
- Asakura, T., A. Kuzuhara, R. Tabeta et H. Saito (2002). Conformational characterization of Bombyx mori silk fibroin in the solid state by high-frequency carbon-13 cross polarization-magic angle spinning NMR, x-ray diffraction, and infrared spectroscopy. *Macromolecules* **18**, p. 1841-1845.
- Batich, C. et P. Leamy (2003). Biopolymers. in *Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design*. M. Kutz, ed. New-York, NY: McGraw-Hill, p. 11.3-11.30.
- Berthiaume, F. et M. L. Yarmush (2003). Fundamentals of Tissue Engineering. in *Tissue Engineering*. B. H. Palsson, Jeffrey A.; Plonsey, Robert; Bronzino, Joseph D., eds. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 709-749.

- Bouchard, F. et J. Paquin (2009). Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells. *Stem Cells and Development* **18**, p. 1023-1032.
- Braun, F. N. et C. Viney (2003). Modelling self assembly of natural silk solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* **32**, p. 59-65.
- Budyanto, L., Y. Goh et C. Ooi (2009). Fabrication of porous poly(L-lactide) (PLLA) scaffolds for tissue engineering using liquid-liquid phase separation and freeze extraction. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **20**, p. 105-111.
- Calinescu, C., J. Mulhbachter, É. Nadeau, J. M. Fairbrother et M. A. Mateescu (2005). Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for Escherichia coli oral formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **60**, p. 53-60.
- Carew, E. O., F. W. Cooke, J. E. Lemons, B. D. Ratner, I. Vesely et E. Vogler (2004). Properties of materials. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 23-65.
- Carignano, M. A., E. Baskaran, P. B. Shepson et I. Szleifer (2006). Molecular dynamics simulation of ice growth from supercooled pure water and from salt solution. *Annals of Glaciology* **44**, p. 113-117.
- Chawla, G., P. Gupta, V. Koradia et A. K. Bansal (2003). Gastroretention. A means to address regional variability in intestinal drug absorption. *Pharmaceutical technology* **27**, p. 50-68.
- Chen, L., G. E. Remondetto et M. Subirade (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* **17**, p. 272-283.
- Chen, X., Z. Shao, N. S. Marinkovic, L. M. Miller, P. Zhou et M. R. Chance (2001). Conformation transition kinetics of regenerated Bombyx mori silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Biophysical Chemistry* **89**, p. 25-34.
- Chourasia, M. K. et S. K. Jain (2003). Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **6**, p. 33-66.
- Chung, T.-W. et Y.-L. Chang (2010). Silk fibroin/chitosan-hyaluronic acid versus silk fibroin scaffolds for tissue engineering: promoting cell proliferations in vitro. *J Mater Sci: Mater Med* **21**, p. 1343-1351.
- Coury, A. J., R. J. Levy, B. D. Ratner, F. J. Schoen, D. F. Williams et R. L. Williams (2004). Degradation of Materials in the Biological Environment. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 411-454.

- Curtis, J. et A. Colas (2004). Medical Applications of Silicone. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 697-707.
- Durrieu, M. C., S. Pallu, F. Guillemot, R. Bareille, J. Amédée, C. Baquey, C. Labrugère et M. Dard (2004). Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **15**, p. 779-786.
- Edwards, M. K. et M. W. McBurney (1983). The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Developmental Biology* **98**, p. 187-91.
- Fink, A. L. S., S.; Khurana, R.; Oberg, K. A. (2000). Determination of Secondary Structure in Protein Aggregates Using Attenuated Total Reflectance FTIR. in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins*. B. R. Singh, ed. Washington, DC: American Chemical Society, p. 132-144.
- Freyman, T. M., I. V. Yannas et L. J. Gibson (2001). Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials Science* **46**, p. 273-282.
- Fukasawa, T., Z. Y. Deng, M. Ando, T. Ohji et Y. Goto (2001). Pore structure of porous ceramics synthesized from water-based slurry by freeze-dry process. *Journal of Materials Science* **36**, p. 2523-2527.
- Hartman, O., C. Zhang, E. L. Adams, M. C. Farach-Carson, N. J. Petrelli, B. D. Chase et J. F. Rabolt (2009). Microfabricated electrospun collagen membranes for 3-D cancer models and drug screening applications. *Biomacromolecules* **10**, p. 2019-2032.
- Hauch, K. D. (2004). Microscopy for Biomaterials Science. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 396-409.
- He, S.-J., R. Valluzzi et S. P. Gido (1999). Silk I structure in Bombyx mori silk foams. *International Journal of Biological Macromolecules* **24**, p. 187-195.
- Hino, T., M. Tanimoto et S. Shimabayashi (2003). Change in secondary structure of silk fibroin during preparation of its microspheres by spray-drying and exposure to humid atmosphere. *Journal of Colloid Interface Science* **266**, p. 68-73.
- Hoerstrup, S. P., L. Lu, M. J. Lysaght, A. G. Mikos, D. Rein, F. J. Schoen, J. S. Temenoff, J. K. Tessmar et J. P. Vacanti (2004). Tissue engineering. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 709-749.
- Hofmann, S., H. Hagenmüller, A. M. Koch, R. Müller, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, H. P. Merkle et L. Meinel (2007). Control of in vitro tissue-engineered bone-like

- structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials* **28**, p. 1152-1162.
- Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials* **4**, p. 518-524.
- Horan, R. L., K. Antle, A. L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J. E. Moreau, V. Volloch, D. L. Kaplan et G. H. Altman (2005). In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials* **26**, p. 3385-3393.
- Hu, K., F. Cui, Q. Lv, J. Ma, Q. Feng, L. Xu et D. Fan (2008). Preparation of fibroin/recombinant human-like collagen scaffold to promote fibroblasts compatibility. *J Biomed Mater Res Part A* **84A**, p. 483-490.
- Hu, Y., D. W. Grainger, S. R. Winn et J. O. Hollinger (2002). Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems. *Journal of Biomedical Materials Research* **59**, p. 563-572.
- Hutmacher, D. W., T. Schantz, I. Zein, K. W. Ng, S. H. Teoh et K. C. Tan (2001). Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research* **55**, p. 203-216.
- Ishida, M., T. Asakura, M. Yokoi et H. Saito (2002). Solvent- and mechanical-treatment-induced conformational transition of silk fibroins studies by high-resolution solid-state carbon-13 NMR spectroscopy. *Macromolecules* **23**, p. 88-94.
- Ishihara, K., Y. Fukuchi, W. Mizunoya, Y. Mita, Y. Fukuya, T. Fushiki et K. Yasumoto (2003). Amino acid composition of soybean protein increased postprandial carbohydrate oxidation in diabetic mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**, p. 2505-2511.
- Jin, H.-J., S. V. Fridrikh, G. C. Rutledge et D. L. Kaplan (2002). Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* **3**, p. 1233-1239.
- Jin, H.-J. et D. L. Kaplan (2003). Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* **424**, p. 1057-1061.
- Kanno, S., P. K. M. Kim, K. Sallam, J. Lei, T. R. Billiar et L. L. Shears (2004). Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, p. 12277-12281.
- Kaplan, D. L. (1998). Fibrous proteins--silk as a model system. *Polymer Degradation and Stability* **59**, p. 25-32.

- Kim, H. J., U.-J. Kim, G. Vunjak-Novakovic, B.-H. Min et D. L. Kaplan (2005a). Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* **26**, p. 4442-4452.
- Kim, U.-J., J. Park, H. Joo Kim, M. Wada et D. L. Kaplan (2005b). Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* **26**, p. 2775-2785.
- Kohn, D. H. (2003). Bioceramics. in *Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design*. M. Kutz, ed. New-York, NY: McGraw-Hill, p. 13.1-13.24.
- Kwon, S.-M., H.-S. Kim et H.-J. Jin (2009). Multiwalled carbon nanotube cryogels with aligned and non-aligned porous structures. *Polymer* **50**, p. 2786-2792.
- Lawrence, B. D., M. Cronin-Golomb, I. Georgakoudi, D. L. Kaplan et F. G. Omenetto (2008). Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices. *Biomacromolecules* **9**, p. 1214-1220.
- Lawrence, B. D., J. K. Marchant, M. A. Pindrus, F. G. Omenetto et D. L. Kaplan (2009). Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials* **30**, p. 1299-1308.
- Lecoeur, H. (2002). Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Experimental Cell Research* **277**, p. 1-14.
- Lee, K. Y. et D. J. Mooney (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews* **101**, p. 1869-1880.
- Lenaerts, V., I. Moussa, Y. Dumoulin, F. Mebsout, F. Chouinard, P. Szabo, M. A. Mateescu, L. Cartilier et R. Marchessault (1998). Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances. *Journal of Controlled Release* **53**, p. 225-234.
- Li, C., C. Vepari, H.-J. Jin, H. J. Kim et D. L. Kaplan (2006). Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, p. 3115-3124.
- Li, M., Z. Wu, C. Zhang, S. Lu, H. Yan, D. Huang et H. Ye (2001). Study on porous silk fibroin materials. II. Preparation and characteristics of spongy porous silk fibroin materials. *Journal of Applied Polymer Science* **79**, p. 2192-2199.
- Liu, C. Z., Z. D. Xia, Z. W. Han, P. A. Hulley, J. T. Triffitt et J. T. Czernuszka (2008). Novel 3D collagen scaffolds fabricated by indirect printing technique for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **85B**, p. 519-528.
- Liu, L., M. L. Fishman, K. B. Hicks, M. Kende et G. Ruthel (2006). Pectin/Zein beads for potential colon-specific drug delivery: synthesis and *in vitro* evaluation. *Drug Delivery* **13**, p. 417-423.

- Losi, E., R. Bettini, P. Santi, F. Sonvico, G. Colombo, K. Lofthus, P. Colombo et N. A. Peppas (2006). Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **111**, p. 212-218.
- Lv, Q., C. Cao, Y. Zhang, X. Ma et H. Zhu (2005). Preparation of insoluble fibroin films without methanol treatment. *Journal of Applied Polymer Science* **96**, p. 2168-2173.
- Madihally, S. V. et H. W. T. Matthew (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **20**, p. 1133-1142.
- Mandal, B. B. et S. C. Kundu (2009). Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* **30**, p. 2956-2965.
- Marolt, D., A. Augst, L. E. Freed, C. Vepari, R. Fajardo, N. Patel, M. Gray, M. Farley, D. Kaplan et G. Vunjak-Novakovic (2006). Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials* **27**, p. 6138-6149.
- Marsh, R. E., R. B. Corey et L. Pauling (1955). An investigation of the structure of silk fibroin. *Biochimica et Biophysica Acta* **16**, p. 1-34.
- McBurney, M. W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *International Journal of Developmental Biology* **37**, p. 135-140.
- McBurney, M. W., E. M. V. Jones-Villeneuve, M. K. S. Edwards et P. J. Anderson (1982). Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* **299**, p. 165-167.
- Meinel, L., O. Betz, R. Fajardo, S. Hofmann, A. Nazarian, E. Cory, M. Hilbe, J. McCool, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, H. P. Merkle, B. Rechenberg, D. L. Kaplan et C. Kirker-Head (2006). Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone* **39**, p. 922-931.
- Mulhbachter, J., P. Ispas-Szabo, V. Lenaerts et M. A. Mateescu (2001). Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *Journal of Controlled Release* **76**, p. 51-58.
- Mulhbachter, J., P. Ispas-Szabo et M. A. Mateescu (2004). Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release: II. Swelling properties and mechanistic study. *International Journal of Pharmaceutics* **278**, p. 231-238.
- Nabais, T., F. Brouillet, S. Kyriacos, M. Mroueh, P. Amores da Silva, B. Bataille, C. Chebli et L. Cartilier (2007). High-amylose carboxymethyl starch matrices for oral sustained drug-release: In vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **65**, p. 371-378.

- Nam, J. et Y. H. Park (2001). Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. *Journal of Applied Polymer Science* **81**, p. 3008-3021.
- Nam, Y. S. et T. G. Park (1999). Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials* **20**, p. 1783-1790.
- Nazarov, R., H.-J. Jin et D. L. Kaplan (2004). Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules* **5**, p. 718-726.
- Paquin, J., B. A. Danalache, M. Jankowski, S. M. McCann et J. Gutkowska (2002). Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, p. 9550-5.
- Parish, C. R. et C. Parish (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology & Cell Biology* **77**, p. 499-508.
- Park, J. B. (1984). *Biomaterials science and engineering*. New-York, NY: Plenum Press. 459 p.
- Pauling, L. et R. B. Corey (1951a). Atomic coordinates and structure factors for two helical configurations of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **37**, p. 235-240.
- Pauling, L. et R. B. Corey (1951b). Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **37**, p. 729-740.
- Pauling, L. et R. B. Corey (1951c). The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **37**, p. 251-256.
- Pauling, L. et R. B. Corey (1951d). The structure of hair, muscle, and related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **37**, p. 261-271.
- Perasso, R., C. Z. Zhou, Z. G. Li, F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin et M. Dugué (2000). Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Research* **28**, p. 2413-2419.
- Puppo, M. C., C. E. Lupano et M. C. Anon (1995). Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, p. 2356-2361.
- Ratner, B. D., A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons (2004). Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to*

- Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 1-10.
- Ren, L., K. Tsuru, S. Hayakawa et A. Osaka (2002). Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering. *Biomaterials* **23**, p. 4765-4773.
- Rodriguez, E. R., C. D. Tan, U. S. Onwuta, Z. X. Yu, V. J. Ferrans et J. E. Parrillo (1994). 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine induces cardiac myocyte differentiation but not neuronal differentiation in P19 teratocarcinoma cells in a dose dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **205**, p. 652-8.
- Rouessac, F. et A. Rouessac (2000). *Analyse Chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Paris: Dunod. 430 p.
- Rudnicki, M. A. et M. W. McBurney (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. E. J. Robertson: IRL Press, Oxford, p. 19-49.
- Sashina, E., A. Bochek, N. Novoselov et D. Kirichenko (2006). Structure and solubility of natural silk fibroin. *Russian Journal of Applied Chemistry* **79**, p. 869-876.
- Servoli, E., D. Maniglio, A. Motta, R. Predazzer et C. Migliaresi (2005). Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. *Macromolecular Bioscience* **5**, p. 1175-1183.
- Shao, Z. et F. Vollrath (2002). Materials: Surprising strength of silkworm silk. *Nature* **418**, p. 741-741.
- Shen, Y., M. A. Johnson et D. C. Martin (1998). Microstructural characterization of bombyx mori silk fibers. *Macromolecules* **31**, p. 8857-8864.
- Singh, B. R. (2000). Basic Aspects of the Technique and Applications of Infrared Spectroscopy of Peptides Proteins. in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins*. B. R. Singh, ed. Washington, DC: American Chemical Society, p. 2-37.
- Skerjanc, I. S. (1999a). Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends in Cardiovascul Med* **9**, p. 139-143.
- Skerjanc, I. S. (1999b). Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends in Cardiovascular Medicine* **9**, p. 139-143.
- Sofia, S., M. B. McCarthy, G. Gronowicz et D. L. Kaplan (2001). Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* **54**, p. 139-148.
- Stokols, S. et M. H. Tuszynski (2004). The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* **25**, p. 5839-5846.

- Suzuki, T., K. Fujikura, T. Higashiyama et K. Takata (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **45**, p. 49-54.
- Takahashi, T., B. Lord, P. C. Schulze, R. M. Fryer, S. S. Sarang, S. R. Gullans et R. T. Lee (2003). Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* **107**, p. 1912-6.
- Tamada, Y. (2005). New process to form a silk fibroin porous 3-D structure. *Biomacromolecules* **6**, p. 3100-3106.
- Uebersax, L., H. P. Merkle et L. Meinel (2008). Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Controlled Release* **127**, p. 12-21.
- Velema, J. et D. Kaplan (2006). Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Tissue engineering I. Advances in biochemical engineering/biotechnology*. K. Lee et D. Kaplan: Springer Berlin / Heidelberg. **102**, p. 187-238.
- Vepari, C. et D. L. Kaplan (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science* **32**, p. 991-1007.
- Voet, D. et J. G. Voet (1998). *Biochimie*. Paris: De Boeck Université. 1361 p.
- Vrbka, L. et P. Jungwirth (2005). Brine rejection from freezing salt solutions: a molecular dynamics study. *Physical Review Letters* **95**, p. 148501.1-148501.4.
- Vrbka, L. et P. Jungwirth (2007). Molecular dynamics simulations of freezing of water and salt solutions. *Journal of Molecular Liquids* **134**, p. 64-70.
- Wang, X., H. J. Kim, C. Wong, C. Vepari, A. Matsumoto et D. L. Kaplan (2006). Fibrous proteins and tissue engineering. *Materials Today* **9**, p. 44-53.
- Wang, Y., U.-J. Kim, D. J. Blasioli, H.-J. Kim et D. L. Kaplan (2005). In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **26**, p. 7082-7094.
- Weber, D., Y. Pu et C. L. Cooney (2008). Quantification of lubricant activity of magnesium stearate by atomic force microscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **34**, p. 1097 - 1099.
- Weston, S. A. et C. R. Parish (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies: Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Journal of Immunological Methods* **133**, p. 87-97.

- Wilson, H. R. (1966). *Diffraction of X-rays by Proteins, Nucleic Acids and Viruses*. London: Edward Arnold. 137 p.
- Yamada, H., H. Nakao, Y. Takasu et K. Tsubouchi (2001). Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. *Materials Science and Engineering: C* **14**, p. 41-46.
- Yannas, I. V. (2004). Natural Materials. in *Biomaterials Science 2nd Edition: An Introduction to Materials in Medicine*. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen et J. E. Lemons, eds. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, p. 127-137.
- Zaritzky, N. (2005). Physical-Chemical Principles in Freezing. *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. D.-W. Sun. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 3-32.
- Zhang, H. et A. I. Cooper (2007). Aligned porous structures by directional freezing. *Advanced Materials* **19**, p. 1529-1533.
- Zhu, J., H. Shao et X. Hu (2007). Morphology and structure of electrospun mats from regenerated silk fibroin aqueous solutions with adjusting pH. *International Journal of Biological Macromolecules* **41**, p. 469-474.
- Zmora, S., R. Glicklis et S. Cohen (2002). Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials* **23**, p. 4087-4094.