PHASES DENSES DE COLLAGÈNE DE TYPE I:TRANSITION ISOTROPE/CHOLESTÉRIQUE, FIBRILLOGENÈSE ET MINÉRALISATION

Frédéric Gobeaux

▶ **To cite this version:**

Frédéric Gobeaux. PHASES DENSES DE COLLAGÈNE DE TYPE I:TRANSITION ISOTROPE/CHOLESTÉRIQUE, FIBRILLOGENÈSE ET MINÉRALISATION. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00337402

HAL Id: tel-00337402

https://theses.hal.science/tel-00337402

Submitted on 6 Nov 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE
PIERRE & MARIE CURIE
LA SCIENCE A PARIS

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Biophysique moléculaire

Présentée par
Mr. Frédéric Gobeaux

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

PHASES DENSES DE COLLAGÈNE DE TYPE I : TRANSITION ISOTROPE/CHOLESTÉRIQUE, FIBRILLOGENÈSE ET MINÉRALISATION

Soutenue le mardi 25 septembre 2007

devant le jury composé de :

Mme Gervaise MOSSER	Directrice de thèse
Mr Patrick DAVIDSON	Co-directeur de thèse
Mr Seth FRADEN	Rapporteur
Mr Michel van der REST	Rapporteur
Mr Serge PÉREZ	Président du jury
Mr Ludovic JULLIEN	Examinateur
Mr Emmanuel BELAMIE	Encadrant

Remerciements

Chez nous, même les films on y avait droit en fonction du grade.
Si on n'est pas docteur, on n'aura pas les meilleures places au cinéma.
- Alexandre Zinoviev[*]

Ce travail a été réalisé entre le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris dirigé par M. Clément Sanchez et le Laboratoire de Physique des Solides d'Orsay dirigé par M. Jean-Paul Pouget. Gervaise Mosser, Emmanuel Belamie et Patrick Davidson m'ont guidé tout au long de ces trois années. Qu'ils en soient remerciés ici ; si ce travail possède quelque qualité, elle leur est due. Tout trois m'ont communiqué bien plus que leur savoir scientifique. Je tiens à remercier Messieurs Seth Fraden et Michel van der Rest d'avoir accepté la charge de rapporteur, ainsi qu'à Messieurs Serge Pérez et Ludovic Jullien, d'avoir accepté de lire et de juger ce travail… Il me faut aussi rendre hommage à Marie-Madeleine Giraud-Guille et à Yves Bouligand, sans qui tout ce travail n'aurait eu aucun sens, et d'une façon générale à toute l'équipe « Matériaux du Vivant » : ce fut tout à la fois un plaisir, un honneur et un privilège de participer… Citons en premier lieu mon *sparring partner*, Sylvain Vigier, mais aussi Anny Anglo et Christophe Hélary. Anny s'est évertuée à découper mes innombrables échantillons afin que je puisse les observer en MET et Christophe m'a initié à la biochimie du collagène : purification, dosage et électrophorèses. Chantal Accarie, Corinne Illoul et Doriane Damo ont aussi à l'occasion mis la main à la pâte. Je remercie également Pierre Panine, Sophie Asnacios, Marc Schmutz et Nadine Nassif avec qui j'ai pu collaborer plus étroitement. Merci aussi à Patrick Le Griel, Hélène Gervais, Corinne Pozzo Di Borgo et Brigitte Loir. Je remercie aussi David Monterro, du service commun de microscopie de Jussieu pour l'accès à l'appareil de séchage supercritique. Au LPS, j'ai bénéficié de l'aide et de la sympathie de Jean-François Sadoc, Pierre-Antoine Albouy, Pascale Launois, Marianne Impéror-Clerc, Doru Constantin, Brigitte Pansu, Michèle Véber, Stéphane Rouzière, Denis Petermann, Françoise Livolant, Amélie Leforestier, Jean Doucet, Gilles, Amélie Lecchi, Vasile Heresanu... Je salue aussi tous les doctorants et post-docs des deux laboratoires, notamment David Chiche, Arnaud Dessombz, John Bass, Belèn Rodriguez-Sanchez, Makhlouf Amoura, Andreas Poulos, Alida Quach, David Portehault, Stéphanie Péga, Matthieu Chorro… Une thèse est aussi faite de voyages et je souhaite témoigner de mon amitié à ceux que j'ai pu croiser à l'occasion : Laurent Michot, Éric Grelet, Joshua Blouwolf, Christian Bonhomme, Thierry Azaïs, Nathalie Steunou, Kirsten Purdy, Phil Huang, Philippe Mésini, Laurent Heux, Samira Elazzouzi, Émilie Pouget… Merci aussi à Jean-Philippe Échard et Marie Soares-Woerle de m'avoir donné l'envie de poursuivre dans cette voie. Merci à mes parents et à mon frère Nicolas pour leur soutien. Et enfin à tout ceux qui prendront la peine de lire ce qui va suivre et qui y trouverons (peut-être) un peu d'intérêt. Et à Claire, bien sûr.

À tous[†]:

Tack !

[*] "Notes d'un veilleur de nuit" (L'Âge d'Homme, 1979), traduit du russe par Wladimir Berelowitch.
[†] Y compris à ceux que j'ai – momentanément – oubliés ici.

Table des matières

Koyu, le religieux, dit : seule une personne de compréhension réduite désire arranger les choses en séries complètes.
C'est l'incomplétude qui est désirable. En tout, mauvaise est la régularité.
Dans les palais d'autrefois, on laissait toujours un bâtiment inachevé, obligatoirement.
- Yoshida No Kaneyoshi[*]

Introduction 9

Références de l'Introduction **13**

Chapitre 1 : Le système étudié : les phases denses de collagène *in vitro* 15

1.1 La molécule de collagène **15**
1.1.1 Rôle structural du collagène. 15
1.1.2 La famille des collagènes 16
1.1.3 La structure du collagène de type I 18
Structure primaire *18*
Structures secondaire et tertiaire *19*
Structure quaternaire *19*
Modifications co- et post-traductionnelles *21*
1.1.4 Propriétés physico-chimiques du collagène de type I 22
Charge nette portée par le collagène *22*
Flexibilité *23*
1.1.5 Dénaturation du collagène en gélatine 24

1.2 Préparation des solutions de collagène **26**
1.2.1 Extraction du collagène 26
Sources de collagène *26*
Protocole d'extraction *26*
Effet des ultrasons *27*
Extraction à pH basique *27*
1.2.2 Caractérisation 28
Caractérisation de la pureté *28*
1.2.3 Concentration des échantillons 29
Concentration par évaporation *29*
Concentration par osmose inverse *30*
Dosage/Titration des concentrations *30*
Conditionnement des échantillons *31*

1.3 Techniques **32**
1.3.1 Microscopie optique à lumière polarisée 32
La biréfringence *33*
1.3.2 Diffusion des rayons X 35
Principe *35*
Ligne de lumière ID02 *36*
Montages de laboratoire *37*
Analyse des clichés *37*

[*] "Tsuredzure Gusa", XVIème siècle, cité par H. Michaux en exergue de "Passages" (Gallimard, 1963)

1.3.3 Microscopie électronique à transmission 37
Fixation chimique *38*
Inclusion *38*
Ultramicrotomie *38*
Coloration *39*
Observation *39*
1.3.4 Microscopie électronique à balayage **39**
Séchage supercritique *39*
Observatione *39*
Références du Chapitre 1 **40**
ANNEXE 1 : Protocole d'extraction du collagène de type I de tendons de queues de rat 45
ANNEXE 2 : Protocole de dosage de l'hydroxyproline 47
ANNEXE 3 : Protocole de préparation des gels d'électrophorèse 49
ANNEXE 4 : Protocole de fixation pour la microscopie électronique 53

Chapitre 2 : Etude de la transition isotrope/cholestérique dans les solutions denses de collagène 55

2.1 Le collagène : un exemple de cristal liquide lyotrope **56**
2.1.1 Généralités sur les cristaux liquides 56
2.1.2 Macromolécules biologiques formant des phases cristal liquides 57
2.1.3 Aperçu théorique de la transition ordre-désordre : mécanique statistique 58
2.2 Résultats **62**
2.2.1 Textures et séquences de phases 62
Texture en bandes *65*
Séparation de phases *68*
Influence du solvant sur la transition *69*
2.2.2 Diffusion des rayons X aux petits angles 71
Solutions isotropes concentrées *73*
Solutions anisotropes *75*
Mesure du paramètre d'ordre *78*
Loi de dilution *80*
2.3 Comparaison aux modèles théoriques **82**
2.3.1 Théorie de volume exclu (Onsager-Lee) en régime électrostatique 82
Formalisme *82*
Calcul de D_{eff} *84*
2.3.2 Prise en compte de la flexibilité des molécules 85
Modèle numérique de Chen *85*
Largeur du fuseau biphasique *89*
Addendum juillet 2007 *90*
2.4 Conclusion **91**
Références du Chapitre 2 **93**
ANNEXE 5 : Influence du cisaillement sur le signal de diffusion nématique 99
ANNEXE 6 : Exemple de calcul avec le modèle de Chen 101

Chapitre 3 : Caractérisation rhéologique de solutions de collagène – gélification 103

3.1 Généralités **104**
3.1.1 Comportement rhéologique et structure microscopique : modèle moléculaire 105
Ecoulement de solutions de polymères linéaires *105*
Gélification/Transition sol-gel *106*
Propriétés rhéologiques des polymères cristaux-liquides nématiques *107*
3.2 Résultats et discussion **109**
3.2.1 Observations visuelles 109
3.2.2 Expériences en cellule de Couette 109
Matériel *110*
Rhéogrammes *111*
Influence de la force ionique *112*
Conclusion *112*

3.2.3 Géométrie cône-plan 113
Préliminaires *113*
Protocole expérimental *114*
Précisaillement, test en fluage et recherche du domaine linéaire *116*
Vieillisement en fonction du temps *117*
Balayage en fréquences *118*
Influence de la concentration *120*
Expériences en régime permanent *121*
Application de la loi de superposition de Cox-Merz *123*
Influence de la température *126*
3.3 Conclusion **126**
Le collagène, un fluide complexe *126*
Compétition entre organisation cholestérique et la gélification *126*
Références du Chapitre 3 **128**

Chapitre 4 : La fibrillogenèse *in vitro* en milieu dense 131
4.1 Les fibres de collagène/rappels bibliographiques **132**
4.1.1 Structure des fibres de collagène 132
Organisation axiale des triples hélices dans les fibrilles *133*
Organisation latérale des triples hélices dans les fibrilles *136*
Conclusion sous forme d'avertissement *136*
4.1.2 La fibrillogenèse in vivo 137
4.1.3 Etude de la fibrillogenèse *in vitro* dans la littérature 137
*Précipitation induite thermiquement (*Heat precipitation*)* *138*
Concentration *138*
Quelques mots de terminologie *138*
Modèle mécanistique de la fibrillogenèse in vitro *139*
Thermodynamique de la fibrillogenèse *142*
Rôle des télopeptides *142*
La réticulation du collagène *142*
Autres « arrangements fibrillaires » *143*
Rôle de molécules biologiques annexes *144*
4.1.4 Fibrillogenèse *in vitro* par clivage du procollagène *144*
4.2 Préparation des échantillons / Protocole expérimental **145**
Préparation des solutions acides *145*
Diffusion de vapeurs *145*
Dialyse contre un tampon *145*
Évaluation de l'absorption de la lumière *147*
4.3 Résultats et discussion **148**
4.3.1 Diffusion des rayons X 148
Pic de corrélation latéral (signal équatorial) *149*
Réflexions périodiques axiales (signal méridional) *150*
Comparaison avec les fibres natives de collagène *150*
Dégâts d'irradiation *151*
4.3.2 Microscopies électroniques 151
Microscopie Electronique en Transmission *151*
Microscopie Electronique à Balayage *152*
4.3.3 Influence de la concentration en milieu acide 153
Observations optiques *153*
Diffusion des rayons X *153*
Microscopie électronique *154*
Discussion *155*
4.3.4 Influence de la concentration en milieu neutre et basique 156
Observations optiques *156*
Diffusion des rayons X *156*
Microscopie électronique à transmission *158*
Discussion *160*
4.3.5 Influence du pH 163
Observations optiques *163*
Diffusion des rayons X *163*
Microscopie électronique *164*

Conclusion *166*
4.3.6 Influence de la force ionique 167
Observations optiques *167*
Diffusion des rayons X *167*
Microscopie Electronique *169*
Conclusion *171*
4.3.7 Quelques remarques sur la cinétique 172
Cinétique à court terme *172*
Observations optiques *172*
Diffusion des rayons X *173*
Cinétique à long terme (vieillissement des gels) *173*
Réticulation *173*
4.4 Conclusion **174**
Implications biologiques *175*
Implication dans les sciences des matériaux *176*
4.5 Perspectives **176**
Références du Chapitre 4 **178**

Chapitre 5 : Minéralisation de matrices denses et ordonnées de collagène 185
5.1 Contexte **186**
5.1.1 Historique et relations à l étude de la morphogenèse 186
5.1.2 Structures biologiques 188
L'os en tant que tissu vivant *188*
Nature du minéral *188*
Interaction collagène-minéral *191*
5.1.3 Expériences de (re-)minéralisation *in vitro* 193
5.2 Synthèses et caractérisation **193**
5.2.1 Références 194
5.2.2 Immersion dans un sérum artificiel (SBF) 194
Synthèse *195*
Caractérisation *195*
5.2.3 Double diffusion 198
Synthèse *198*
Caractérisation *199*
5.2.4 Coprécipitation des phases organique et minérale par remontée de pH 201
Synthèse *201*
Caractérisation *202*
5.2.5 Récapitulation 203
5.2.6 Etude préliminaire par microscopie électronique à transmission 204
5.2.7 Limite de la méthode 206
5.3 Conclusion et perspectives **207**
Références du Chapitre 5 **209**

Conclusion et perspectives 213
Références de la conclusion **218**

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES FRÉQUEMMENT UTILISÉS 221
INDEX ALPHABÉTIQUE DES RÉFÉRENCES CITÉES 223
PUBLICATIONS 239
"Cooperative Ordering of Collagen Triple Helices in the Dense State"
"*In Vitro* Collagen Fibrillogenesis in the Dense State: a Physico-Chemical Study"

Introduction

Le matin, quand on est abeille, pas d'histoire, il faut aller butiner.
- Henri Michaux[*]

Les protéines et les phénomènes d'auto-assemblage et d'auto-organisation

Les protéines sont des macromolécules biologiques tridimensionnelles constituées d'un enchaînement linéaire d'acides aminés (structure primaire) qui se replie par la suite en une structure secondaire et tertiaire. Ces sous-unités vont ensuite s'agencer dans l'espace pour former la structure quaternaire d'une molécule plus complexe. La structure tridimensionnelle spécifique confère aux protéines leur activité biologique. Si la machinerie génétique est responsable de la biosynthèse de la structure primaire, les processus de repliement et d'auto-assemblage subséquents sont essentiellement guidés par des réactions enzymatiques et/ou simplement par des interactions relevant de la physico-chimie. Enfin, de nombreuses modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu.

D'une façon générale, les termes « autoassemblage » et « auto-organisation » se réfèrent à "l'intégration d'éléments isolés dans une structure fonctionnelle émergente"[1], une structure « autoassemblée » se rapportant plutôt à une structure à l'équilibre et l'auto-organisation décrivant plutôt un processus loin de l'équilibre.

Les phénomènes d'auto-assemblage moléculaire décrivent donc l'organisation spontanée des molécules en des arrangements stables et de structures bien définies, dans des conditions d'équilibre thermodynamique *via* des interactions non covalentes. Ces interactions sont typiquement des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques et de van der Waals.

Quand elles gagnent en taille, les protéines gagnent en stabilité[2]. L'auto-assemblage de sous-unités identiques semble être une caractéristique commune à l'organisation de nombreux organismes. Ce mécanisme permet d'utiliser efficacement l'information génétique dans la construction de grands édifices intra- ou extracellulaires. En effet, il est plus économique de ne

[*] "Tranches de savoir" *in* "Face aux verrous" (Gallimard, 1967)

coder que les premières « briques » (ou sous-unités élémentaires), la suite de la construction à grande échelle étant induite par les propriétés physico-chimiques. Un très bon exemple de système biologique auto-assemblé est celui du cytosquelette constitué principalement des filaments d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires. Chacun de ces éléments est constitué de petites protéines de quelques nanomètres formant des édifices pouvant s'étendre sur plusieurs microns. Si les phénomènes d'auto-assemblage moléculaires sont bien établis, les phénomènes d'auto-assemblage pour former des structures à une échelle supramoléculaires (des tissus, par exemple) le sont beaucoup moins. Notamment, des analogies avec les cristaux-liquides ont été proposées pour expliquer ce type de mise en ordre. C'est dans ce cadre particulier que se situe le travail présenté dans ce manuscrit en s'intéressant plus spécifiquement au cas du collagène.

Le collagène est la protéine la plus abondante chez les mammifères[†]. C'est une protéine structurale majeure des tissus conjonctifs, dans lesquels il remplit le rôle d'armature. En effet, les types de collagène les plus abondants s'assemblent sous la forme de fibrilles dont la résistance, à poids égal, surpasse celle de l'acier. Ils sont associés au sein d'édifices supramoléculaires à de nombreux autres types de collagène[3-7] et ainsi qu'à d'autres macromolécules partenaires. Les fibrilles de collagène sont non seulement responsables de la rigidité des tissus, mais aussi de leur architecture spécifique qui leur confère des propriétés particulières. Ainsi, suivant les tissus considérés, le collagène sera organisé de façon spécifique, de manière à répondre de façon optimale à ses fonctions. Les exemples les plus spectaculaires sont ceux de la structure hélicoïdale de l'os compact[8,9], du « contreplaqué » ultra régulé de la cornée[10-12] et de la directionnalité des tendons[13,14]. En revanche, dans les viscères et le derme, les fibrilles de collagène sont enchevêtrées irrégulièrement dans tous les sens.

Une mauvaise conformation du collagène peut ainsi provoquer des dysfonctionnements dans les phénomènes d'assemblage à l'origine de graves pathologies, souvent d'origines génétiques[15-19]. Parmi les plus connues, citons le scorbut, l'ostéogenèse imparfaite (ou maladie des « os de verre ») ou encore les syndromes d'Ehler-Danlos qui se signalent par une hyperélasticité des tissus (d'où le syndrome de « l'homme caoutchouc »).

La structure des molécules de la famille des collagènes – qui pour être répétitive n'en est pas moins originale – prend la forme d'une triple hélice droite résultant de l'association de trois chaînes polypeptidique (chaînes α) organisées en hélices gauches. Ces chaînes α ont une structure différente de celle des hélices α couramment rencontrées dans la plupart des autres protéines.

[†] On cite généralement la proportion de 25% de toutes les protéines du corps.

Cette configuration est permise par la grande régularité de la séquence d'acides aminés, et notamment de la présence d'une glycine tous les trois résidus.

En résumé, l'étude du collagène est particulièrement stimulante du point de vue structural puisqu'elle fait intervenir un grand nombre de niveaux hiérarchiques, depuis l'assemblage d'une séquence particulière d'acides aminés jusqu'à la formation d'un tissu vivant complexe tel que l'os, en passant par l'assemblage en fibrilles hautement organisées. Si nous ne nous sommes pas penchés sur chacun de ces aspects, nous tâcherons néanmoins d'en mentionner rapidement la plupart d'entre eux. De plus, même si le collagène n'est pas forcément un système très aisément manipulable, il constitue potentiellement un système intéressant car il s'agit de l'un des rares exemples de polyélectrolyte semi-flexible hélicoïdal.

D'une façon générale, l'objectif principal de cette thèse était de considérer la structure et la thermodynamique de systèmes dont plusieurs états avaient été observés auparavant[20-22]. D'une part, nous avons cherché à comprendre les mécanismes par lesquels on aboutissait à la formation d'une phase cholestérique et à différentes textures afférentes. D'autre part, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de formation d'un gel fibrillaire en milieu dense et en particulier à la relation entre la taille des fibrilles à des paramètres physicochimiques bien définis. Enfin, nous avons voulu considérer la possibilité de minéraliser de telles matrices organisées. Il nous a donc fallu mettre au point un protocole de purification nous permettant d'atteindre à la fois un degré de pureté honorable et de produire des quantités suffisantes pour mener à bien notre programme d'expériences. Ainsi, nous avons pu accéder à des domaines de concentrations auparavant peu étudiés[‡], tout en contrôlant le pH et la force ionique du milieu. L'ensemble de ces différentes étapes est décrit à travers cinq chapitres.

Dans un premier chapitre, nous décrirons plus en détails la molécule de collagène, notamment sa structure, avant de présenter le protocole d'extraction et de purification que nous avons utilisé, préliminaire indispensable à l'étude physico-chimique qui suivra. Ce chapitre contient aussi un aperçu rapide des principales techniques mises en œuvre pour ce travail : microscopie optique à lumière polarisée, diffusion des rayons X et microscopies électroniques.

Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude des solutions acides concentrées de collagène. Nous nous pencherons tout particulièrement sur l'étude de la transition isotrope/nématique, c'est-à-dire l'auto-organisation des solutions (ou suspensions colloïdales) en

‡ Pour donner un ordre d'idée, dans la littérature, la concentration maximale étudiée dans le cadre de la fibrillogenèse est de l'ordre de 10-20 mg/ml, pour la rhéologie de 37 mg/ml, là où nous sommes allés jusqu'à 300 mg/ml. Quant aux précédentes études de la phase nématique, les concentrations n'étaient pas directement connues.

une phase cristal liquide. Nous évoquerons aussi l'évolution des propriétés viscoélastiques dans la même gamme de concentration à l'aide d'une étude rhéologique sommaire présentée dans le troisième chapitre.

Dans le chapitre 4, il sera question du phénomène de fibrillogenèse, au cours duquel les molécules s'assemblent spontanément dans des édifices supramoléculaires, les fibrilles de collagène. Les nœuds de réticulation que constituent les fibrilles conduisent à la formation d'un gel organique. Enfin, dans un dernier chapitre, nous évoquerons brièvement quelques tentatives de minéralisation des matrices denses de collagène précédemment obtenues.

Références de l'Introduction

[1] Bourgine P. et Lesne A. (sous la direction de) "Morphogenèse – L'origine des formes" Ed. Belin (Paris), Collection Echelles (2006) p. 18.

[2] Perham R.N. "Self-assembly of Biological Macromolecules" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **272** (1975) 123-136.

[3] Berthod F., Germain L., Guignard R., Lethias C., Garrone R., Damour O., vander Rest M., Auger F.A. "Differential Expression of Collagens XII and XIV in Human Skin and in Reconstructed Skin" *J. Invest. Dermat.* **108** (1997) 737-742.

[4] van der Rest M. et Bruckner P. "Collagens: Diversity at the Molecular and Supramolecular and Supramolecular Levels" *Current Opinion in Structural Biology* **3**:3 (1993) 430-436.

[5] van der Rest M. et Garonne R. "Collagen Family of Proteins" *FASEB J.* **5** (1992) 2814-2823

[6] Ricard-Blum S., Ruggiero F., van der Rest "The Collagen Superfamily" *Collagen Topics in Current Chemistry* **247** (2005) 35-84.

[7] Kadler K.E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R.P. "Collagens at a Glance" *J. Cell Science* **120** (2007) 1955-1958.

[8] Giraud-Guille M.-M. "Twisted Plywood Architecture of Collagen Fibrils in Human Compact Bone Osteons" *Calcif. Tissue Int.* **42** (1988) 167-180.

[9] Weiner S., Traub W., Wagner H.D. "Lamellar Bone: Structure-Function Relations" *J. Struct. Biol.* **126** (1999) 241-255.

[10] Bloom W. et Fawcett D.W. "A Textbook of Histology" 9th Edition Philadelphia: W.B. Saunders Company (1968) 780.

[11] Coulombre J. et Coulombre A. "Corneal Development, Treatment of Five Day Old Embryos of Domestic Fowl with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON)" *Developmental Biology* **45** (19975) 291-303.

[12] Meek K.M. et Fullwood N.J. "Corneal and Scleral Collagens – a Microscopist's Perspective" Micron **32** (2001) 261-272.

[13] Dlugosz J., Gathercole L.J., Keller A. "Transmission Electron Microscope Studies and their Relation to Polarizing Optical Microscopy in Rat Tail Tendon" *Micron* **9** (1978) 71-82.

[14] Diamant J., Keller A., Baer E., Litt M., Arridge R.G.C. "Collagen: Ultrastructure and its Relation to Mechanical Properties as a Function of Ageing" *Proc. R. Soc. Lond. B* **180** (1972) 293-315.

[15] Myllyharju J. et Kiviriko K.I. "Collagens and Collagens-related Diseases" *Ann. Med.* **33** (2001) 7-21.

[16] Prockop D.J. "What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it?" *Matrix Biol.* **16** (1998) 519-528.

[17] Kuivaniemi H., Tromp G., Prockop D.J. "Mutations in Collagen Genes: Causes of Rare and Some Common Diseases in Humans" *FASEBS J.* **5** (1991) 2052-2060.

[18] Byers P.H. "Folding Defects in Fibrillar Collagens" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **356** (2001) 151-158.

[19] Kadler, K.E. "Learning How Mutations in Type I Collagen Genes Cause Connective Tissue Disease" *Int. J. Exp. Pathol.* **74** 319–323 (1993).

[20] Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen" *Biology of the Cell* **67** (1989) 97-101.

[21] Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystallinity in Condensed Type I Collagen Solutions – A Clue to the Packing of Collagen in Extracellular Matrices" *J. Mol. Biol.* **224** (1992) 861-873.

[22] Mosser G., Anglo A., Helary C., Bouligand Y., Giraud-Guille M.-M. "Dense Tissue-like Collagen Matrices Formed in Cell-free Conditions" *Matrix Biology* **25** (2006) 3-13.

Chapitre 1

Le système étudié : les phases denses de collagène *in vitro*

And in a pessimistic mood, we often worried that correct structure might be dull. That is, it would suggest absolutely nothing and excite us no more than something inert like collagen.
- James D. Watson[*]

However it is sometimes necessary to repeat what all know.
All mapmakers should place the Mississippi in the same location, and avoid originality.
It may be boring, but one has to know where he is.
We cannot have the Mississippi flowing towards the Rockies for a change.
- Saul Bellow[†]

Dans ce chapitre nous présenterons dans un premier temps de façon assez générale la molécule qui nous a occupés tout au long de ce travail. Nous montrerons son importance en tant que scléroprotéine et décrirons sa structure particulière. Dans un deuxième temps, nous présenterons le protocole de purification du collagène utilisé, et enfin les principales techniques de caractérisation mises en oeuvre : microscopie optique à lumière polarisée, diffusion de rayons X et microscopies électroniques.

1.1 La molécule de collagène

1.1.1 Rôle structural du collagène

Le collagène est une protéine omniprésente dans le règne animal. Chez les vertébrés, il représente un tiers des protéines de l'organisme et, dans une bien moindre mesure, on le

[*] "The involvement of RNA in the synthesis of proteins", Nobel Lecture (1962)
[†] "Mr. Sammler's Planet" (Penguin, 1972)

rencontre aussi chez les insectes, les arthropodes ainsi que dans de nombreuses sécrétions. Il est localisé dans les tissus conjonctifs qu'il contribue à structurer en se déployant en un réseau fibrillaire. Ce réseau participe à la constitution d'une matrice extracellulaire spécifique sécrétée par les cellules qui confère à ces tissus leur forme, leur résistance mécanique et leur flexibilité. Les tissus conjonctifs relient les organes et constituent des barrières mécaniques et fonctionnelles entre eux. Ces tissus sont faits de cellules dispersées dans une matrice que ces dernières ont elles-mêmes sécrétées. La matrice en question est en grande partie constituée de fibrilles de collagène associées à d'autres types de collagènes non fibrillaires, de nombreuses autres protéines comme la fibrine et l'élastine, et les protéoglycanes. Cet ensemble, de composition très variable suivant les tissus considérés, est baigné dans du fluide interstitiel qui contient de l'eau, des ions et différentes macromolécules circulantes. Enfin, dans le cas des tissus minéralisés, des cristaux de phosphate de calcium (apatite) sont aussi associés à la composante organique de la matrice extracellulaire.

On trouve les collagènes fibrillaires principalement dans la peau (40%), les os et la dentine (10-20%), le cartilage et les tendons auxquels ils confèrent leurs propriétés mécaniques spécifiques[1-3]. Le collagène joue aussi un rôle primordial dans l'œil, puisqu'il contribue aux propriétés optiques de la scléra et de la cornée[4], respectivement l'opacité et la transparence.

1.1.2 La famille des collagènes

Le nom « collagène » est en fait utilisé comme terme générique pour les protéines formant une triple hélice caractéristique de trois chaînes α ; tous les membres de la famille des collagènes[5-8] forment des structures supramoléculaires[9] dans la matrice extracellulaire même si leur taille, leur fonction et leur distribution dans les tissus peuvent varier considérablement. Jusqu'à présent, 28 types de collagènes ont été identifiés et classés dans sept familles différentes suivant leur structure et leur organisation supramoléculaire (Cf. Tableau 1 et Tableau 2). Les différents types de collagènes sont caractérisés par la complexité et la variété de leur structure, et la présence de domaines non hélicoïdaux additionnels. Par la suite, nous nous concentrerons sur les collagènes fibrillaires (« famille A »), et plus particulièrement sur le collagène de type I, le plus abondant, puisqu'il représente 90% des collagènes. Néanmoins, la description du domaine hélicoïdal principal est valide pour tous les autres types de collagène, à quelques variations de séquence près.

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes familles de collagène (Prockop-Kiriviko 1995)

A	Collagènes formant des fibrilles à striations périodiques
B	Collagènes formant des réseaux
C	Collagènes trouvés en surface des fibrilles (« Collagènes Associés aux Fibrilles avec Triple hélice Interrompue » ou FACITs)
D	Collagènes formant des filaments perlés
E	Collagènes associés aux fibrilles d'ancrage des épithéliums
F	Collagènes transmembranaires
G	Nouveaux collagènes partiellement déterminés
H	Protéines contenant des domaines en triples hélices non définies comme du collagène (car ne participant pas à l'assemblage de la matrice extracellulaire)

Tableau 2 : Récapitulatif des différents types de collagène (Prockop-Kiriviko 1995, Kadler 2007)

Type de Collagène	Famille	Gène	Localisation
I	A	*COL1A1*	Tissus conjonctifs
		COL1A2	(os, derme, tendon, ligaments, cornée)
II	A	*COL2A1*	Cartilage, humeur vitreuse
III	A	*COL3A1*	Peau, poumons, système vasculaire
IV	B	*COL4A1*	Membranes basales
		COL4A2	
		COL4A3	
		COL4A4	
		COL4A5	
		COL4A6	
V	A	*COL5A1*	Tissus conjonctifs (composant mineur)
		COL5A2	
		COL5A3	
VI	D	*COL6A1*	Tissus conjonctifs
		COL6A2	
		COL6A3	
		COL6A7	
VII	E	*COL7A1*	Fibrilles d'ancrage
VIII	B	*COL8A1*	Endothélium, membrane de Descemet
		COL8A2	
IX	C	*COL9A1*	Tissus contenant du collagène II
		COL9A2	
X	B	*COL10A1*	Cartilage hypertrophique
XI	A	*COL11A1*	Cartilage, humeur vitreuse
		COL11A2	
		COL11A3	
XII	C	*COL12A1*	Tissus contenant du collagène I
XIII	F	*COL13A1*	Divers tissus
XIV	C	*COL14A1*	Tissus contenant du collagène I
XV	G	*COL15A1*	Divers tissus dont pancréas
XVI	C	*COL16A1*	Divers tissus
XVII	F	*COL17A1*	Peau
XVIII	G	*COL18A1*	Divers tissus dont foie et rate
XIX	C	*COL19A1*	Cellule rabdomyosarcoma
XX	C	*COL20A1*	Epithélium Cornéal
XXI	C	*COL21A1*	Parois des vaisseaux sanguins
XXII	C	*COL22A1*	Associé aux fibrilles ?
XXIII	F	*COL23A1*	Jonctions spécifiques de tissus
XXIV	A	*COL24A1*	Collagène transmembranaire
XXV	F	*COL25A1*	Tissus contenant du collagène I
XXVI	D	*COL26A1*	Collagène transmembranaire
XXVII	A	*COL27A1*	Testicules et ovaires adultes
XXVIII	D	*COL28A1*	Cartilage

1.1.3 La structure du collagène de type I

Structure primaire – La structure primaire d'une protéine correspond à la séquence des acides aminés dont elle est constituée. Une chaîne α de collagène est constituée d'un millier d'acides aminés, dont un sur trois est une Glycine. La séquence peut donc être schématisée comme une suite de triplets $(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$, où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé, mais qui le plus souvent est la proline ou l'hydroxyproline, qui constituent 30% des résidus X et Y. Suivant le type de collagène considéré, les chaînes α peuvent être différentes. Elles sont donc indexées par un chiffre romain correspondant au type de collagène et un chiffre arabe pour les différencier à l'intérieur d'une même molécule. Ainsi, une molécule de collagène de type V est composée de trois chaînes α différentes : α1(V), α2(V) et α3(V). Les séquences de la plupart des types de collagène sont disponibles dans des bases de données sur les protéines telles que Swissprot‡.

Dans de nombreux cas, ce qui est réellement connu est la séquence de nucléotides plutôt que la séquence d'acides aminés. Aussi, compte tenu des nombreuses modifications post-traductionnelles, la correspondance entre les nucléotides et les acides aminés n'est pas triviale. En particulier, il a été montré que l'hydroxylation des lysines et des prolines joue un rôle structurel et fonctionnel non négligeable.

L'analyse minutieuse de la structure primaire fait apparaître différents motifs[10], notamment la répétition périodique de certaines séquences caractéristiques. En particulier, la distribution de certains acides aminés (Lysine, Glutamine et Arginine) présente chez les collagène fibrillaires une périodicité de 18 résidus, tandis que l'agglomération de résidus polaires et hydrophobes apparaît tous les 234 résidus (= D = 67 nm). Nous verrons plus tard que ces motifs périodiques jouent un rôle dans l'organisation particulière des molécules de collagène à l'intérieur des fibrilles.

Enfin, notons que du fait de l'asymétrie de la séquence d'acides aminés et de la polarité de ces derniers, qui pointent tous dans la même direction de par la nature de la liaison peptidique, la molécule de collagène présente une polarité ; aussi distingue-t-on les extrémités N-terminale et C-terminale.

‡ http://www.expasy.org/sprot/

Structures secondaire (et tertiaire) – La régularité de la séquence du domaine central des chaînes α leur permet de s'organiser en hélice *gauche*, dans laquelle la distance axiale entre deux résidus est de 0,286 nm et la séparation de 108° (Figure 1). Ce repliement est principalement dû aux répulsions stériques entre les résidus de proline en position X et les 4-hydroxyprolines en position Y. Il est donc largement dépendant des modifications post-traductionnelles. Le pas de l'hélice est de 8,68 nm. La structure tertiaire correspond à la linéarité de la structure.
Contrairement aux « hélices α » *droites* rencontrées dans la plupart des autres protéines (avec les feuillets β), les « chaînes α » du collagène ne sont stabilisées par aucune liaison hydrogène intrachaîne.

Structure quaternaire – La présence de nombreuses glycines (dont la chaîne latérale se réduit à un hydrogène) le long des chaînes α permet à celles-ci de s'associer en une triple hélice *droite* stabilisée par des liaisons hydrogène (Figure 1). D'ailleurs, la suppression ou la substitution d'une glycine par un résidu plus encombrant empêche la formation d'une triple hélice[11,12] et conduit à de nombreuses maladies congénitales du type ostéogenèse imparfaite[13,14] ou autre[15]. Les chaînes latérales des acides aminés sont disposées radialement sur la surface cylindrique de la molécule ; elles sont donc accessibles pour des interactions avec le solvant et/ou les autres molécules de collagène[16] (Figure 1, à droite). Suivant le type de collagène considéré, la triple hélice peut être constituée de trois chaînes α identiques (on parle alors d'*homotrimère*) ou de chaînes différentes (*hétérotrimère*), assemblées par un mécanisme de type « fermeture éclair » (*zipper-like*) depuis la région C-terminale jusqu'à la région N-terminale[17,18]. Dans le cas du collagène de type I qui nous intéresse ici, la triple hélice résulte de l'association de deux chaînes α1(I) et d'une chaîne α2(I).

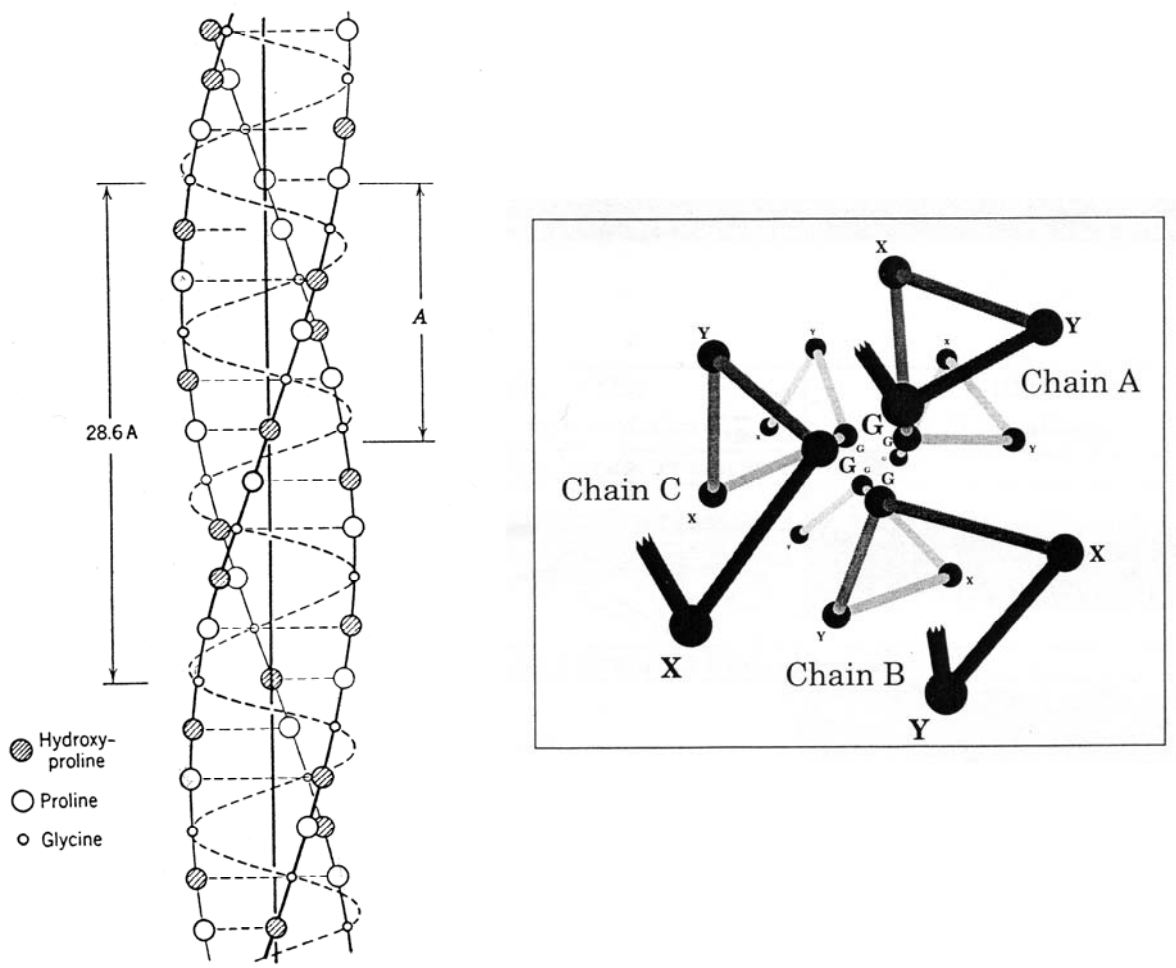


Figure 1 : Vues schématiques de la triple hélice de collagène. À gauche : Modèle de la structure en triple hélice de collagène de A. Rich (détail). Tiré de Schmitt (1959)[19]. **À droite :** Pour des raisons de moindre encombrement, les glycines sont au cœur de la triple hélice. Les chaînes latérales des résidus X et Y pointant, elles, vers l'extérieur. Tiré de van der Rest et Garonne (1992).

*

En réalité, le collagène de type I est synthétisé et sécrété dans la matrice extracellulaire par la cellule sous forme de procollagène, un précurseur soluble dans le milieu physiologique. C'est le clivage enzymatique des deux domaines globulaires terminaux (Figure 2), connus sous le nom de propeptides C et N, dont la séquence d'acides aminés n'est pas constituée d'une répétition de triades Gly-X-Y, qui va donner la molécule de collagène proprement dite, aussi nommée « tropocollagène ». Cette molécule est, elle, insoluble dans les conditions et concentrations physiologiques et va s'assembler sous forme de fibrilles et de fibres organisées qui vont structurer les espaces extracellulaires. Nous décrirons plus en détails la structure de ces édifices et discuterons de leur formation *in vivo* et *in vitro* dans le Chapitre 4.

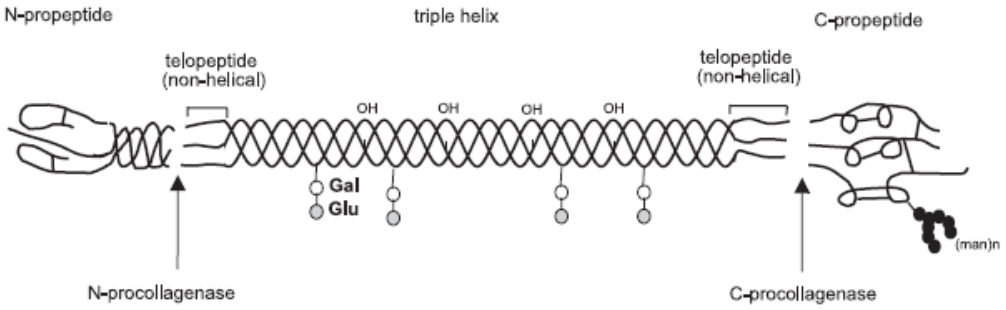


Figure 2 : Structure moléculaire du procollagène de type I. Le domaine hélicoïdal central est flanqué de protéoglycanes. Les flèches indiquent les sites de clivage des propeptides N et C par respectivement les N- et C-procollagénases. Les télopeptides sont les extrémités non hélicoïdales du collagène clivé. Reproduit de Gelse *et coll.* (2003)[20].

*

Modifications post-traductionnelles – La chaîne protéique du collagène contient un grand nombre d'hydroxylysines et d'hydroxyprolines. Ces acides aminés sont dérivés de la proline et de la lysine au cours d'un processus enzymatique post-traductionnel qui requiert de la vitamine C (acide ascorbique). C'est pourquoi une carence en vitamine C provoque le scorbut, qui se manifeste par une résistance réduite des tissus conjonctifs due au collagène défectueux. Le symptôme le plus connu et le plus spectaculaire en est le déchaussement des dents. Aussi a-t-on observé que le taux d'hydroxylation de la proline augmente la stabilité des triples hélices.
Enfin, le groupe hydroxyle des lysines permet l'attachement sur les molécules de collagène de sucres (glucose et galactose) par des liaisons covalentes (Figure 2).

*

La molécule résultant de ces diverses associations et modifications est une molécule semi-flexible de 300 nm de long et de 1,5 nm de diamètre.

1.1.4 Propriétés physico-chimiques du collagène de type I

Les chaînes latérales des résidus X et Y sont tournées vers l'extérieur de la triple-hélice et contribuent à définir les interactions du collagène avec le solvant et sa rugosité stérique. Les acides aminés peuvent être classés comme hydrophobes (phénylalanine), hydrophiles neutres (glycine, valine, proline, alanine, sérine…), acides (aspartate, glutamate) ou basiques (arginine, lysine) ; au total, les résidus ionisables représentent 15 à 20% de la séquence primaire.

Du point de vue physico chimique, la molécule de collagène est donc un polyélectrolyte au caractère amphotère : elle peut se comporter à la fois comme un acide (donneur de protons) ou comme une base (accepteur de protons).

Charge nette portée par le collagène – Connaissant la séquence d'acides aminés des trois chaînes α qui composent la molécule de collagène, nous pouvons nous faire une idée de la répartition des charges le long de la molécule. Cette répartition apparaît relativement homogène. Par ailleurs, on peut calculer approximativement la charge nette des protéines en fonction du pH au vu de leur séquence. Par exemple, nous avons utilisé une feuille de calcul[§] fournie par l'université du Maine pour obtenir la Figure 3. Il suffit de saisir le nombre de résidus acides et basiques et, connaissant leurs pK_a respectifs, nous obtenons la charge nette résultante. Nous avons aussi tenu compte du taux d'hydroxylation de 20% des lysines[21] qui a pour effet d'abaisser le pK_a de l'amine de la chaîne latérale.

Qualitativement, cette figure illustre plusieurs comportements connus du collagène, et nous servira plus loin à discuter certains résultats. Remarquons pour l'instant que dans de l'acide acétique à 500 mM, soit à pH 2,5, la charge nette du collagène est à son maximum : 259 charges positives. Les répulsions électrostatiques sont donc maximales ; il n'est donc pas étonnant que dans ces conditions le collagène soit soluble. En revanche, à pH physiologique (pH 7,4), avec seulement 38 charges positives, nous sommes très proches du point isoélectrique (pH~9,8) or, expérimentalement, nous savons que le collagène précipite sous forme de fibrilles quand les solutions acides sont neutralisées.

Naturellement, ce calcul reste très approximatif, car le point isoélectrique dépend fortement des ions en solution et de leur force ionique[22], ce dont nous ne tenons pas compte ici. De plus, les pK_a utilisés pour ce calcul sont ceux des acides aminés individuels, qui peuvent être différents dans une chaîne protéique.

§ www.usm.maine.edu/~rhodes/Goodies/PeptChg.xls (dernière consultation le 01/07/07)

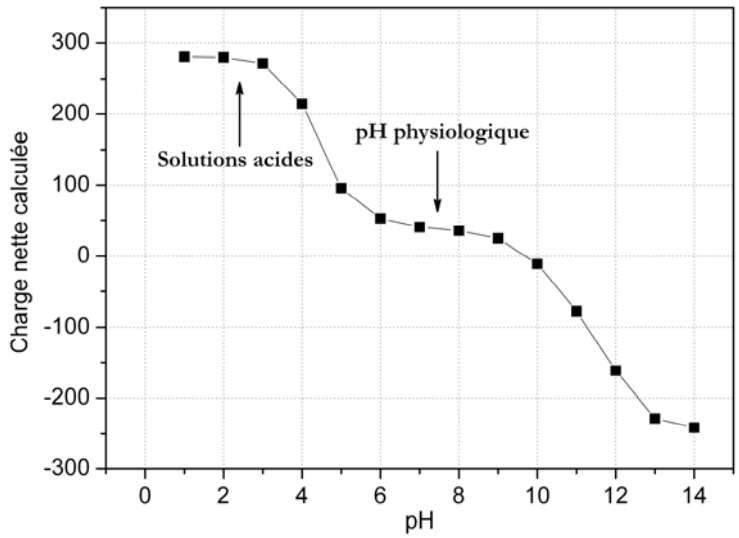


Figure 3 : Tracé de la charge nette du collagène calculée d'après sa séquence d'acides aminée en fonction du pH. Le calcul a été effectué avec Charge Calculator III (voir références dans le texte).

*

Flexibilité de la molécule – Si, en première approximation, on peut se contenter de modéliser la triple hélice de collagène comme un bâtonnet, l'observation d'un étalement moléculaire (Figure 4) convaincra chacun que le domaine hélicoïdal central de la molécule de collagène est particulièrement flexible. Il s'agit donc d'un paramètre dont il faudra éventuellement tenir compte lorsque nous chercherons à interpréter le comportement du collagène en solution et à appliquer des modèles théoriques. En effet, la flexibilité influence notamment les conditions de la transition isotrope/nématique et les propriétés rhéologiques des macromolécules en solutions.

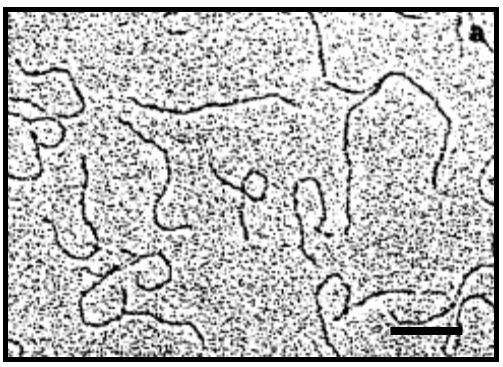


Figure 4 : Etalement moléculaire de triples hélices de collagène (ombrage au platine). Tiré de M.-M. Giraud-Guille (1989)[23]. Barre d'échelle ~ 50 nm.

Un paramètre crucial pour caractériser la flexibilité d'un polymère est sa longueur de persistance *P*, qui décrit la longueur sur laquelle deux vecteurs tangents sont corrélés. La flexibilité *a* est, elle, décrite par le rapport entre la longueur totale de la molécule *L* et sa longueur de persistance *P* :

$$a = \frac{L}{P} \qquad \textbf{(1)}$$

Quand $a<<1$, un polymère est très rigide et peut être modélisé par un bâtonnet, tandis que si $a>>1$, il est flexible. Dans ce dernier cas, il est mieux modélisé par une chaîne de segments rigides « articulés » (segments de Kühn) voire par le modèle continu de chaîne vermiculaire (*wormlike chain*). Dans le cas présent, où *L* et *P* sont du même ordre de grandeur, on parle de molécule semi-flexible. Cependant, il faut garder à l'esprit que la longueur de persistance d'un polyélectrolyte peut varier en fonction de sa concentration et du solvant, notamment en fonction de la force ionique de ce dernier[24], ou encore de la température[25]. Aussi, il existe dans la littérature différentes valeurs proposées pour le collagène, suivant les conditions expérimentales, mais aussi selon la méthode de détermination utilisée. Nous en avons rapportées quelques unes dans le Tableau 3. Les valeurs les plus plausibles dans notre cas sont celles de l'ordre de la centaine de nanomètres, mesurées en solution par des techniques « globales » (diffusion dynamique de la lumière, mesures de viscosité[28,29] et de sédimentation). Les valeurs les plus faibles sont obtenues par des mesures de tractions sur molécules uniques ou sur des micrographies d'étalement moléculaires[30,**].

Tableau 3 : quelques longueurs de persistance du collagène trouvées dans la littérature.

Longueur de persistance P	*Flexibilité a*	*Méthode de détermination*
160 nm	1,88	Diffusion de lumière[26,27], mesure de viscosité[28]
140 nm	2,14	Mesures de sédimentation[29]
112 nm	2,68	Diffusion de lumière
57 nm	5,26	Étalements moléculaires [30]
14,5 nm	20,69	Traction sur molécule unique[31]

1.1.5 Dénaturation du collagène en gélatine

De façon assez surprenante, alors que le collagène est le principal constituant de la plupart des tissus vivants, il est instable à 37°C[32,33]. En fait, le suivi de la dénaturation par fluorescence et calorimétrie montre que le collagène commence à se dénaturer dès 20°C[34]. La viscosité intrinsèque et le pouvoir rotatoire des solutions chutent[35]. Les liaisons peptidiques ne sont évidemment pas rompues, mais la structure en triple hélice est perdue. Les chaînes α adoptent

** Dans le cas des étalements moléculaires, les interactions avec le substrat en mica augmentent de façon notoire les contraintes sur la molécule, ce qui conduit à sous-estimer la longueur de persistance.

alors une conformation de pelote statistique. On obtient ainsi de la gélatine dont les propriétés sont aussi relativement intéressantes et ont trouvé de multiples applications dans des domaines aussi divers que la photographie et l'agroalimentaire. Contrairement au collagène natif, il est facile d'obtenir de la gélatine en grandes quantités puisqu'il suffit de cuire des carcasses d'animaux (la production mondiale est de 250000 tonnes par an).

À l'échelle macroscopique, la gélatine est liquide à température ambiante (20-25°C) et forme un gel quand elle est refroidie. Ce comportement s'explique à l'échelle moléculaire par l'existence d'une transition pelote-hélice[36] (Figure 5). Au-dessus de la température de transition, les chaînes α sont emmêlées mais peuvent facilement glisser les unes par rapport aux autres. En revanche, en dessous, il se reforme localement des triples hélices[37] qui agissent comme autant de points de blocage. Il y a donc formation d'un gel physique[38]. Pour autant, les triples hélices se forment de façon aléatoire et uniquement locale, sans jamais reformer de véritables molécules de collagène. La dénaturation du collagène est donc irréversible et toutes ses propriétés d'auto-assemblage (transition isotrope/nématique, fibrillogenèse) sont perdues.

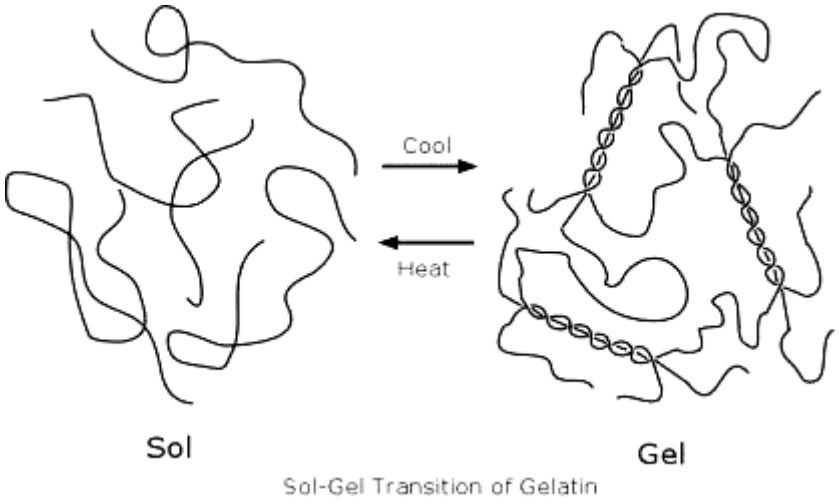


Figure 5 : Schématisation de la structure moléculaire de la gélatine. Au-dessus de 20°C, la gélatine se présente sous la forme d'un liquide (phase sol). Quand cette phase est refroidie, il se forme des nœuds de réticulation sous la forme de triples hélices et une phase gel est obtenue. Récupéré via GoogleImage††.

†† http://www.tuat.ac.jp/~ushiki/lab2001/chem01/esaki/c_esa01.htm (consulté le 05/07/2007)

1.2 Préparation des solutions de collagène

1.2.1 Extraction du collagène de type I

Sources de collagène – Différents protocoles d'extraction du collagène sont décrits dans la littérature[39,40]. Les sources de collagène de type I utilisées sont principalement les tendons de queues de rats ou le derme de veau.

Dans notre cas, les queues de rat dont nous avons extrait le collagène proviennent principalement de rats sacrifiés à l'animalerie de Jussieu. Dans la mesure du possible nous n'avons utilisé que des queues de rats Wistar jeunes (moins de 8 semaines) et n'ayant pas subi de traitement particulier (contrôles négatifs). En effet, en vieillissant, il se crée des liaisons covalentes entre les fibrilles de collagène, ce qui les rend moins solubles et pourrait nuire à la pureté (monodispersité) des solutions.

Le protocole suivi pour produire les solutions mères utilisées pour ce travail est un protocole modifié par rapport à celui traditionnellement utilisé dans le laboratoire[41,42]. En effet, les expériences de physico-chimie requièrent des solutions les plus pures possibles ou, du moins, très semblables d'une extraction à l'autre. Cependant, malgré ces précautions, certaines extractions ont conduit à des solutions dont le comportement, notamment rhéologique et de fluorescence, divergeait beaucoup des autres lots sans que nous ayons pu en déterminer la cause. L'hypothèse la plus probable serait la mauvaise qualité des tendons dans ce lot particulier, liée par exemple à un problème de conservation des queues. Nous n'avons donc pas utilisé ces solutions par la suite.

Malgré tout, étant donné les quantités de collagène nécessaires pour préparer des séries d'échantillons très concentrés, nous n'avons pu nous imposer un protocole trop drastique, ce qui excluait par exemple une purification poussée faisant usage de colonnes chromatographiques[43].

Protocole d'extraction – Les tendons sont prélevés sur les queues de rats à l'aide de pinces, sous une hotte de culture cellulaire stérile, et immédiatement recueillis dans un bécher de PBS (Phosphate Buffer Saline, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na_2HPO_4 8,07 mM, NaH_2PO_4 1,47 mM). Les tendons sont lavés et centrifugés plusieurs fois dans du PBS jusqu'à ce que le surnageant soit limpide afin d'éliminer les cellules et les traces de sang. Les tendons sont ensuite placés dans une solution de NaCl 4 M afin de lyser les cellules résiduelles par choc osmotique et de faire précipiter d'éventuelles protéines de haut poids moléculaire. Après un nouveau rinçage au PBS, les tendons propres sont solubilisés dans de l'acide acétique 500 mM stérile. La solution est

clarifiée par une première étape de centrifugation à 41000 × *g* pendant 2 heures. Certaines protéines solubles peuvent être précipitées sélectivement par ajout de 300 mM de NaCl dans le surnageant, et éliminées par centrifugation à 41000 × *g* pendant 3 heures. L'ajout de 300 mM supplémentaires fait précipiter le collagène qui est récupéré sous forme de culots par centrifugation à 3000 × *g* pendant 45 minutes. Ces culots sont resolubilisés dans de l'acide acétique à 500 mM, et la solution dialysée contre le même solvant (quatre bains successifs de 24 heures, 1 volume pour 10) afin d'éliminer toute trace de sel. La solution est conservée à 4°C et centrifugée à 41000 × *g* pendant 4 heures avant usage pour éliminer les insolubles restants. (Le protocole détaillé est fourni en annexe 1).

Effet des ultrasons – Ce protocole exclut toute étape de sonication afin d'éviter de produire des fragments de collagène plus courts[44,45]. Nous faisons par la suite l'hypothèse de la monodispersité des molécules. Néanmoins, il est possible qu'il reste en solution des agrégats de 2 ou 3 molécules en équilibre en solution, dont Silver *et coll.* ont montré l'existence par des expériences de diffusion de lumière[46]. La sonication avait essentiellement pour but de fragmenter de gros agrégats que nous éliminons dorénavant par centrifugation des solutions à haute vitesse avant usage.

*

Les solutions mères ainsi préparées, de concentrations entre 2 et 5 mg/ml, sont conservées à 4°C.

*

Extraction à pH basique – La charge nette du collagène à pH 13 est de –231, c'est-à-dire l'équivalent, de charge opposée, de l'excès de charge positive à pH 3,75. Afin d'étudier la possibilité de former des fibrilles en partant de solutions basiques et non acides, nous avons cherché à obtenir des solutions de collagène à pH proche de 13. Il serait en effet intéressant de pouvoir procéder de cette manière pour tester la spécificité des interactions électrostatiques dans la mise en place du décalage périodique. Yoshimira *et coll.*[47] ont proposé une méthode d'extraction basique du collagène de requin, mais dans ces conditions la solubilité est de seulement 50% et peut conduire à la fragmentation des molécules. Pour ce qui nous concerne, nos tentatives d'extraire le collagène de tendons de queues de rats à pH élevé (soude 1 N) ont été infructueuses.

1.2.2 Caractérisation

Caractérisation de la pureté – La pureté des solutions mères est caractérisée par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gels de polyacrylamide. L'électrophorèse permet de séparer des molécules ou des fragments de molécules en fonction de leur charge électrique. Le milieu de migration est constitué d'un gel aqueux de polyacrylamide coulé entre deux plaques de verre maintenues verticalement. Une différence de potentiel est appliquée entre la base et le sommet du gel qui baigne dans un tampon conducteur. Les échantillons sont introduits au sommet du gel dans différents puits. Un marqueur contenant différentes protéines de poids connus est également déposé dans un puits du même gel, ce qui permet de rapporter la distance de migration à un poids moléculaire.

Dans le système de tampons Laemmli[48] (SDS-PAGE) que nous avons utilisé, le tampon de migration est différent du tampon d'échantillon. Ce dernier contient du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) et du *β*-mercapto-éthanol, un agent réducteur de groupements thiol, qui a pour but de réduire d'éventuels ponts dissulfures entre chaînes polypeptidiques. Les protéines ainsi dénaturées prennent une configuration en pelote statistique. Elles ont alors un rapport charge/masse uniforme, proportionnel à leur masse moléculaire, puisque la surface de la molécule est intégralement recouverte de SDS, un tensioactif chargé négativement. Les témoins des marqueurs de poids moléculaires sont eux aussi dénaturés et se comportent de la même manière. De plus, la vitesse de migration et la résolution dépendent de la taille des pores du gel. Cette taille est contrôlée par la concentration en monomères d'acrylamide utilisé pour fabriquer les gels ou par la proportion d'agent réticulant bis-acrylamide. En routine, nous avons utilisé des gels à 10% en acrylamide/bis-acrylamide (30%) Afin d'explorer toute la gamme de poids moléculaires (PM) de façon optimale, deux autres concentrations de gel sont préparées. Les gels à 15% en acrylamide/bis-acrylamide (30%) permettent de bien séparer les hauts poids moléculaires, tandis que ceux à 5% en acrylamide/bis-acrylamide (30%) permettent de se focaliser sur les bas poids moléculaires. Le protocole détaillé est fourni en annexe 3.
Un gel typique est présenté en Figure 6. Les bandes caractéristiques du collagène sont les quatre bandes les plus intenses. Elles correspondent, par ordre croissant de poids aux brins α_2 (~95 kD) et α_1 (~100 kD) et aux dimères β_{12} (~195 kD) et β_{11} (~200 kD). Des bandes beaucoup moins intenses sont visibles à 46, 55 et 66 kD. Elles pourraient correspondre à de l'albumine, de l'élastine ou à des *Heat-Shock Proteins* (HSD47). La précipitation « sélective » du collagène ne

permet pas d'éliminer ces bandes contaminantes. En revanche, aucune contamination aux très bas poids moléculaires n'est détectée, ce qui exclut la présence de fragments de collagène.

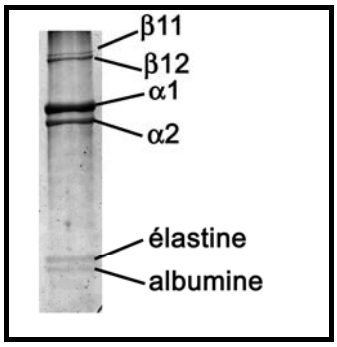


Figure 6 : Gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Toutefois, cette technique ne nous permet pas de détecter des contaminants non protéiques tels que des protéoglycanes dont la présence est connue. Cette caractérisation a aussi échoué à déterminer l'origine de problèmes de purification que nous avons pu rencontrer.
Il se peut aussi que des traces de collagène III et V soient toujours présentes. Une étude en spectrométrie de masse permettrait peut-être de détecter et d'identifier les autres contaminants.

1.2.3 Concentration des échantillons

Les échantillons denses sont préparés à partir des solutions mères de collagène, soit par simple évaporation du solvant, soit par osmose inverse.

Concentration par évaporation – Cette première méthode présente l'avantage de la simplicité : une solution de volume (ou de masse) et de concentration connues de collagène dilué est mise à évaporer en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. L'évaporation peut s'avérer longue, mais elle permet une estimation assez précise de la concentration en cours d'évaporation par simple pesée. De plus, la solution reste accessible pour tester à tout moment sa biréfringence. Ces raisons nous ont conduit à choisir cette méthode pour la construction des séquences de phases au Chapitre 2 (§2.2.1 et Figure 9).
Le principal revers de cette méthode provient de l'évaporation différentielle du solvant. En effet, l'eau s'évapore plus vite que l'acide acétique. Ceci a pour effet d'augmenter la concentration de ce dernier, et donc de modifier le pH et par suite la force ionique des solutions.

Concentration par osmose inverse – Une solution diluée de collagène est dialysée contre une solution de polyéthylène glycol (PEG, Fluka, 35 kD) à travers une membrane en cellulose (Cellu-Sep, taille de pores = 3,5 kD). Le PEG solubilisé dans le solvant adéquat impose à la solution de collagène une pression osmotique. Pour équilibrer la différence de pression osmotique entre l'intérieur du sac de dialyse et le bain de dialyse, les molécules de solvant (eau + acide acétique) diffusent hors du sac où le collagène reste prisonnier du fait de son haut poids moléculaire (~300 kD). Les petits ions pouvant diffuser librement, ils s'équilibrent de chaque côté de la membrane. Le pH et la force ionique sont ainsi imposés à la solution de collagène par la présence de solution de dialyse en large excès volumique.

Cette méthode est assez rapide pour atteindre des concentrations très élevées sans risquer de dessécher totalement la solution de collagène. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature d'étude de la pression osmotique de solutions de collagène dans la gamme de concentration qui nous intéresse. De plus, l'expérience a montré que les temps d'équilibration sont souvent relativement longs, de l'ordre de plusieurs jours, voire semaines. Ainsi, les solutions ont généralement été prélevées avant que l'équilibre ait été atteint, ce qui rend difficile le choix *a priori* d'une concentration finale. Compte tenu des dosages des solutions finales utilisées, nous pouvons cependant proposer la relation empirique $C_{\text{Collagène}} \sim 1{,}5 \times C_{\text{PEG·(35 kD)}}$

Dosage des concentrations – La concentration des solutions est déterminée par un dosage de l'hydroxyproline[49,50], acide aminé quasi spécifique du collagène extrait des tendons de queues de rat qui représente environ 13% de son poids moléculaire.

Le principe est le suivant : une masse connue de collagène est hydrolysée par un excès d'acide chlorhydrique 6 N (une nuit, 108°C) afin de libérer les résidus d'hydroxyproline. Après séchage sous vide (Speedvac), le résidu solide est repris dans 1 ml d'eau déminéralisée. L'hydroxyproline est oxydée par de la chloramine T. Cette réaction est stoppée au bout de 20 minutes par de l'acide perchlorique 3,15 M. Le diméthylamino-4-benzaldéhyde (DMBA) alors ajouté génère un complexe qui sera détecté par spectrophotométrie. Cette réaction s'effectue à 60°C pendant 20 minutes, puis est stoppée par un refroidissement à 4°C. La densité optique des aliquots est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 557 nm et comparée à une gamme étalon d'hydroxyproline. Connaissant la concentration en hydroxyproline des aliquots, nous calculons la concentration en collagène en multipliant le résultat par les différents facteurs de dilutions et par 7,6 (l'hydroxyproline représentant 13% de la masse du collagène). La valeur obtenue correspond en toute rigueur à une concentration massique (milligrammes de collagène

par gramme de solution) mais, la densité des solutions étant peu différente de 1, nous parlerons généralement en concentrations volumiques (mg/ml).

Par suite, la fraction volumique est simplement obtenue en calculant :

$$\Phi = C \times V_{sp} \qquad \textbf{(2)}$$

où C est la concentration obtenue par dosage de l'hydroxyproline (voir § 1.2.3) et V_{sp} est le volume spécifique du collagène dans l'acide acétique, estimé à ~0,71 ml/g (voir Tableau 4 ci-dessous).

Tableau 4 : Quelques volumes spécifiques du collagène trouvés dans la littérature.

Volume partiel spécifique (ml/mg)	**Référérence bibliographique**
0,645 ml/g	Heaps (1966)[51]
0,686 ml/g	Christiansen (1967)[52]
0,73 ml/g	Nishihara & Doty (1958)[53]
0,703-0,710 ml/g	d'après les références données dans Komsa-Penkova (1999)[54]

Le protocole détaillé du dosage de l'hydroxyproline est fourni en annexe 2.

*

Conditionnement des échantillons – Après purification, les solutions peuvent être conservées pendant plusieurs mois à 4°C dans un pilulier étanche pour éviter l'évaporation, la dénaturation et la contamination par des champignons et des bactéries.

1.3 Techniques

Pour ce travail, nous avons principalement mis en œuvre trois techniques complémentaires adaptées aux échelles des différentes organisations étudiées (Figure 7).

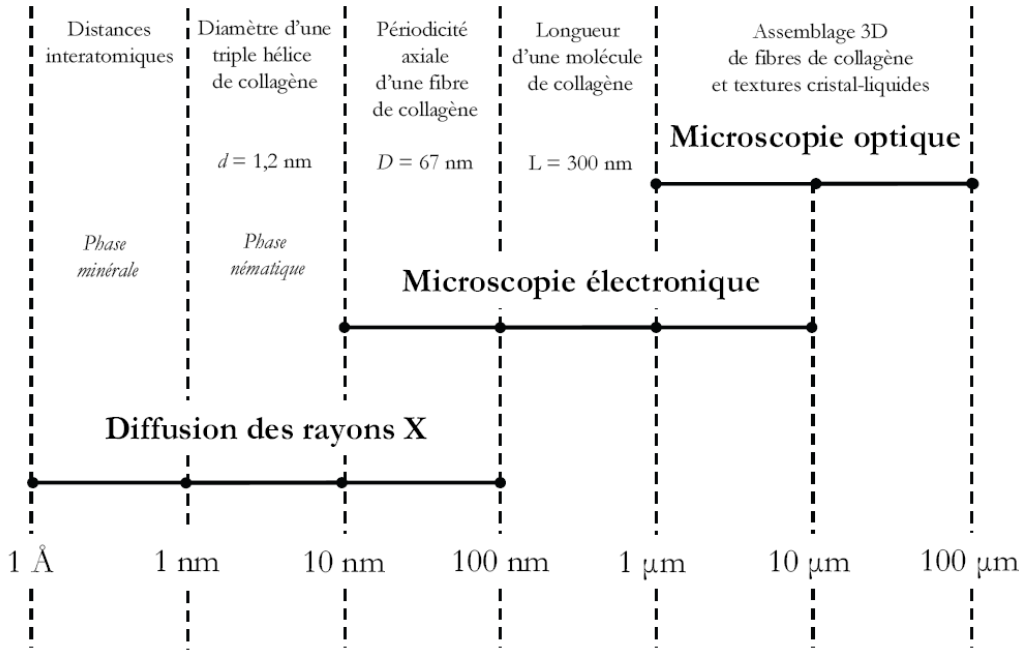


Figure 7 : Comparaison des échelles observées avec les différentes techniques d'analyse mises en œuvre (Figure traduite de Woodhead-Galloway, 1982[55]).

1.3.1 Microscopie optique à lumière polarisée

Pour ce travail, nous avons régulièrement fait usage d'un microscope optique Nikon Eclipse E600 à lumière polarisée, équipé d'une caméra digitale DXM 1200. Cet instrument nous a principalement servi à identifier les textures des phases liquides du collagène (Chapitre 2), mais aussi à estimer l'absorption des gels fibrillaires (Chapitre 4). Il nous a semblé utile de rappeler ci-dessous quelques principes fondamentaux de la polarisation de la lumière.

Dans un milieu isotrope, la lumière se propage à la même vitesse dans toutes les directions de l'espace. Le milieu peut donc être caractérisé par un indice de réfraction unique n, défini par la relation $n = c/v$, où c est la célérité de la lumière dans le vide et v la vitesse de propagation de la lumière dans le milieu considéré.

La biréfringence – La biréfringence (ou double réfraction) d'un milieu résulte de son anisotropie ; ici nous considérons une anisotropie simplement uniaxe[#]. Un tel milieu ne peut plus être caractérisé par un unique indice de réfraction. On définit l'ellipsoïde des indices comme le lieu des points M tels que la distance de O à M soit égale à *n*. Cette surface possède trois axes : n_o, l'indice « ordinaire », correspondant au plus petit indice, n_e, l'indice « extraordinaire », correspondant au plus grand indice. Dans un milieu uniaxe positif, $n_e > n_o$.

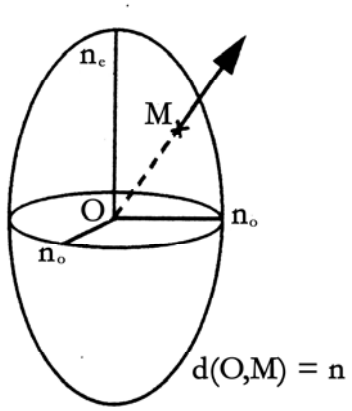


Figure 8 : Ellipsoïde des indices dans un milieu anisotrope (adapté de Bertrand et Roubaud, 1969[56]). La distance du point O à un point M de la surface de l'ellipsoïde est égale à la valeur de l'indice du milieu suivant la direction (OM). Le grand axe de l'ellipsoïde correspond à l'indice extraordinaire n_e du milieu et le petit axe à son indice ordinaire n_o.

La biréfringence est déterminée en plaçant ce milieu entre polariseurs croisés à 90°. Le premier polariseur sélectionne la lumière polarisée linéairement dans une direction donnée. En l'absence d'échantillon (ou en présence d'un échantillon isotrope), l'analyseur orienté à 90° empêche la transmission de cette lumière, provoquant une extinction. On peut décomposer la lumière qui se propage dans un matériau biréfringent en deux composantes suivant les axes propres de l'ellipsoïde des indices. Leur recombinaison rétablit une lumière transmise avec l'intensité *I'* telle que :

$$I' = I \sin^2(2a) \quad \sin^2 \frac{\pi\delta}{\lambda} \qquad \textbf{(3)}$$

Où :

- *I'* est l'intensité lumineuse observée en O à la sortie de l'analyseur
- *I* est l'intensité lumineuse en O à l'entrée du polariseur
- *a* est l'angle formé entre le polariseur et n_e.

[#] Dans les cas où l'anisotropie est biaxe, on parle de *triréfringence*. L'indice de réfraction est alors représenté par un tenseur **n**, dont les valeurs propres sont n_α, n_β et n_γ.

- δ est le retard de la composante de vibration parallèle au polariseur par rapport à la composante de la vibration parallèle à l'analyseur,
- λ est la longueur d'onde de la lumière.

Le retard δ est fonction du milieu anisotrope traversé. Les variations d'intensité en un point d'un même échantillon sont fonction du seul paramètre a, et donc de l'orientation de l'ellipsoïde des indices par rapport à l'axe du polariseur. L'intensité observée sera maximale pour des valeurs de a telles que :

$$\sin^2(2a) = 1 \quad \Rightarrow \quad \text{soit } 2a = \pm \pi/2 \quad \Rightarrow \quad \text{soit } a = \pm \pi/4$$

Et minimale nulle pour des valeurs de a telles que :

$$\sin^2(2a) = 0 \quad \Rightarrow \quad \text{soit } 2a = 0 \pm \pi \quad \Rightarrow \quad \text{soit } a = \pm \pi/2$$

Généralement, la biréfringence est quantifiée par la valeur :

$$\Delta n = n_e - n_o$$

La biréfringence est donc *positive* lorsque $n_e > n_o$, c'est-à-dire lorsque la vitesse de propagation de la lumière ($v = c/n$) est plus importante suivant l'axe ordinaire de l'ellipsoïde. En pratique, on peut mesurer la biréfringence Δn d'un matériau à l'aide d'un microscope à lumière polarisée équipé d'un compensateur de Berek.

La biréfringence mesurée est la résultante de deux types de biréfringence[57] : la *biréfringence intrinsèque* et la *biréfringence de forme*. La *biréfringence intrinsèque* provient de l'effet sur la vitesse de la lumière des différents groupes chimiques dans une configuration ordonnée (par exemple dans un cristal). Certains groupements retardent plus la lumière que d'autres. L'intensité de la biréfringence dépend principalement de l'alignement et de l'ordre dans l'agencement moléculaire, mais aussi de la nature des groupements chimiques rencontrés ainsi que de l'épaisseur de l'échantillon observé. La *biréfringence de forme* est observée quand des particules allongées ou aplaties sont dispersées dans un milieu ayant un indice de réfraction différent. La lumière polarisée dans un plan parallèle à l'axe de bâtonnets ou de disques se propage à une vitesse différente de la lumière polarisée dans un plan perpendiculaire. Quand ces deux types de biréfringence contribuent à la biréfringence d'un objet, le retard résultant est la somme algébrique des deux retards. L'effet de la biréfringence de forme peut cependant être éliminé en dispersant les particules considérées dans un milieu de même indice de réfraction.

L'indice extraordinaire du collagène de type I intervient dans la direction axiale tant des fibrilles que de la molécule elle-même. Les deux biréfringences (*intrinsèque* et *de forme*) contribuent toutes deux de façon positive à la résultante observée.

1.3.2 Diffusion des rayons X

Les rayons X sont un rayonnement électromagnétique de haute énergie et de courte longueur d'onde (10^{-12} m < λ < 10^{-8} m). Les rayons X ont un pouvoir de pénétration bien plus fort que les photons du visible et peuvent donc fournir des informations provenant du cœur de la matière. Par ailleurs, leur courte longueur d'onde permet d'atteindre une résolution de l'ordre des distances interatomiques.

Le signal restitué par la diffusion des rayons X provient de la globalité du volume sondé de l'échantillon ; autrement dit, l'information obtenue sur la structure de l'échantillon est une information moyennée. Un autre avantage de cette technique provient du fait qu'elle permet de sonder les échantillons sans aucune modification. Elle ne nécessite ni de modification de solvant, ni fixation, ni d'ajout de contrastant.

Principe – La diffusion des rayons X est un processus au cours duquel les électrons de la matière interagissent avec le rayonnement incident en modifiant la direction de propagation des photons. Le processus est élastique quand les photons diffusés conservent l'énergie des photons incidents et inélastique quand ils perdent de l'énergie. Si l'on considère les rayons X incidents comme une onde plane, les rayons diffusés sont des ondes sphériques émises par chaque point où la densité électronique est différente de zéro. Le cliché de diffusion que nous enregistrons résulte des interférences entre ces ondes sphériques. Aussi la diffusion des rayons X donne d'autant plus d'informations sur la structure d'un matériau que celui-ci est ordonné. Sous certaines conditions, le cliché de diffusion peut aussi fournir des informations sur l'unité diffusante, c'est-à-dire, dans notre cas particulier, la molécule de collagène. Il s'agit du facteur de forme qui est relatif à la forme et la taille de la molécule.

L'intensité diffusée présente des maxima à des angles 2θ bien définis qui correspondent à des distances caractéristiques dans l'échantillon sondé. L'angle de diffusion est inversement proportionnel à ces distances caractéristiques. Ainsi, dans les systèmes qui nous intéressent où les distances sont bien plus grandes que la longueur d'onde, les maxima d'intensité sont situés à des très petits angles de diffusion. Aussi nous intéresserons nous principalement à la diffusion des

rayons X aux petits angles (ou SAXS pour Small Angle X-ray Scattering). En pratique, nous présenterons les résultats en fonction de *q*, module du vecteur de diffusion défini par la relation :

$$q = \frac{4\pi}{\lambda}\sin\theta \qquad \textbf{(4)}$$

La diffusion des rayons X aux petits angles fournit des informations sur des structures dont les distances caractéristiques sont de l'ordre de 10 à 1000 Å. Elle nécessite des distances échantillon-détecteur de l'ordre de quelques mètres (voir Figure 9). La diffraction des rayons X aux grands angles (WAXS pour Wide Angle X-ray Scattering) donne accès à des structures répétitives dont les périodes sont de l'ordre de 0,1 Å à quelques dizaines d'angströms. La combinaison des deux détections SAXS et WAXS, techniquement difficile, permet de sonder une large gamme de *q* pour un même volume diffusant.

Ligne de lumière ID02 – La plupart des résultats de diffusion des rayons X aux petits angles présentés proviennent d'expériences réalisées à l'aide d'un rayonnement synchrotron. Ils ont été collectés au cours de trois campagnes (*runs*) en juillet 2005, juillet 2006 et juin 2007 sur la ligne ID02 de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble, dont les caractéristiques techniques complètes sont décrites par Narayanan *et coll.*[58] et sur le site internet de l'ESRF[59]. Par ailleurs, cette ligne permet l'utilisation couplée d'un détecteur aux grands angles (WAXS) qui nous a permis d'étudier la minéralisation de matrices de collagène (Chapitre 5). La taille du faisceau était de l'ordre de 100 µm × 200 µm (sauf en 2007 où il était de 50 µm × 50 µm) et sa longueur d'onde ~1 Å (12,4 keV).

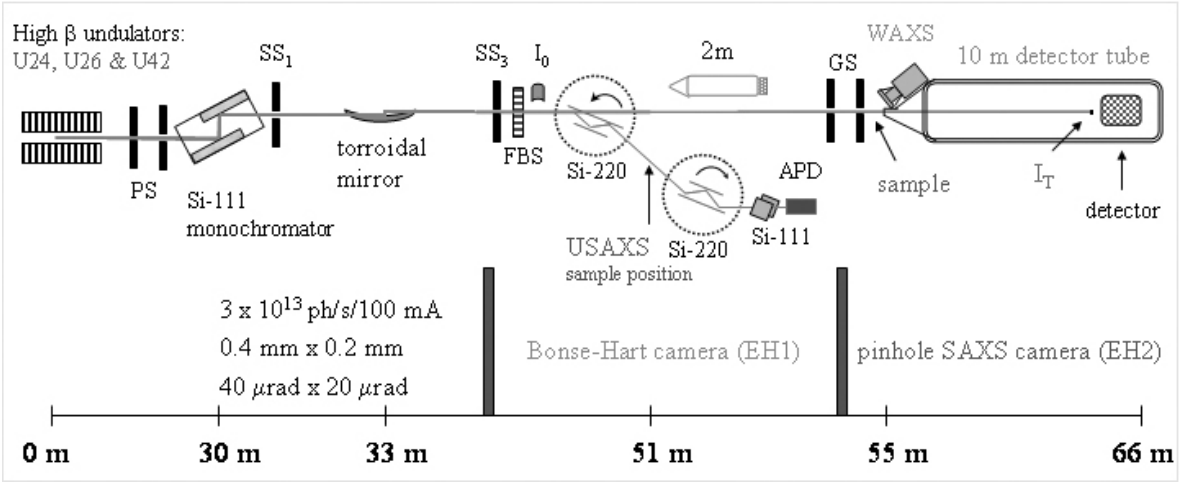


Figure 9 : Schéma du montage de la ligne ID02 à l'ESRF. (Tiré du site internet de l'ESRF)

Montages de laboratoire – Les montages de diffusion/diffraction des rayons X du Laboratoire de Physique des Solides (Orsay) nous ont permis de caractériser nos échantillons et de préparer les campagnes au synchrotron. En effet, certains signaux peuvent être détectables aux grands angles[§§], notamment ceux des phases minérales. Nous avons ainsi pu obtenir quelques résultats préliminaires sur des montages tels que celui schématisé sur la Figure 10. L'utilisation d'enceintes sous vide nous a servi à réduire la diffusion par l'air et nous a donc permis d'augmenter le rapport signal/bruit. Les rayons X étaient produits soit par un générateur conventionnel, soit à anode tournante (au Molybdène ou au Cuivre).

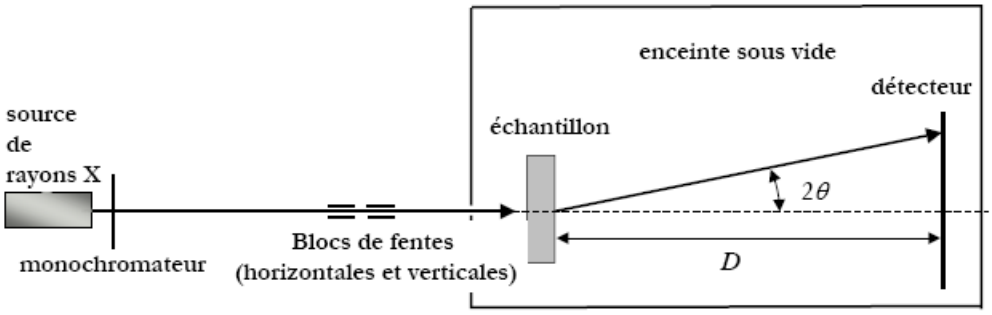


Figure 10 : Schéma générique des montages aux grands angles de laboratoire utilisés pour ce travail. La source de rayons X peut être une anode tournante au cuivre ou au molybdène ou encore un générateur à tube scellé ordinaire. La distance échantillon-détecteur *D* est de l'ordre de quelques centimètres.

Analyse des clichés – Les clichés de diffusion, recueillis soit sur une caméra CCD soit sur des plaques photosensibles (*image plates*), sont traités à l'aide des logiciels Fit2D (ESRF) et Image (LPS).

1.3.3 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique repose sur les mêmes principes que la microscopie optique, à la différence que le rayonnement utilisé provient d'électrons et non de photons. La faible longueur d'onde de ce rayonnement, de l'ordre du picomètre (10^{-12} mètres), permet d'atteindre une résolution atomique. Par ailleurs, comme il s'agit de particules chargées, il est possible de fabriquer des lentilles électromagnétiques permettant de focaliser un faisceau d'électrons. Les contrastes d'absorption au sein de l'échantillon permettent d'imager celui-ci.

Les échantillons devant être placés sous vide, il est nécessaire de les stabiliser, soit par congélation (cryo-MET), soit par fixation chimique et déshydratation. De plus, dans notre cas où les

§§ Nous avons aussi réalisé quelques expériences sur des montages SAXS de laboratoire. Dans les conditions optimales, nous avons pu détecter le signal de la phase nématique ; quant au signal de fibrilles reconstituées de 67 nm, nous étions à la limite de détection.

échantillons sont constitués d'éléments organiques légers, le contraste n'est pas suffisant et il faut rajouter des sels d'atomes lourds pour les « colorer » et les rendre visibles aux électrons. Par ailleurs, l'information obtenue en microscopie électronique à transmission est très locale ; néanmoins nous avons été soucieux de la représentativité des clichés présentés.

Comme les échantillons que nous avons souhaité observer sont des échantillons en volume, nous avons travaillés sur des coupes ultrafines.

Fixation chimique – La fixation chimique a pour but de maintenir la structure microscopique des échantillons en créant des ponts covalents entre les molécules. Les gels fibrillaires de collagène ont été fixés à 4°C pendant une heure dans du glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate (0,033 M, pH 7,4) puis lavés par trois bains de 10 min dans un mélange tampon cacodylate (0,05 M, pH 7,4)/saccharose 0,3 M. Ce fixateur crée des pontages entre les groupement aminés libres des protéines.

Une deuxième fixation est réalisée à 4°C dans du tétraoxyde d'osmium (OsO_4) à 2% dans un mélange tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4)/saccharose 0,3 M pendant une autre heure, suivi d'un nouveau lavage de trois bains de 10 min dans un mélange tampon cacodylate (0,05 M, pH 7,4)/saccharose 0,3 M. Le tétraoxyde d'osmium réagit avec les doubles liaisons.

Les échantillons ont ensuite été progressivement déshydratés dans des bains d'éthanol à 50%, 70% et 95% de 5 min chacun, et enfin dans deux bains de 10 min d'éthanol 100%. L'éthanol est alors remplacé par de l'oxyde de propylène en deux bains de 10 min : le premier dans un mélange 50/50 d'éthanol et d'oxyde de propylène, le second dans de l'oxyde de propylène pur.

Inclusion – Les échantillons déshydratés sont progressivement imprégnés puis inclus dans de l'araldite, dont la composition est la suivante : 20 ml d'araldite CY212 (Agar Scientific), 22 ml de DDSA (Anhydride Dodécenyl Succinique, Agar Scientific) et 1,1 ml de BDMA (Benzyl Diméthyl Amine, Agar Scientific). Ces deux derniers composants sont respectivement des agents durcisseur et accélérateur. L'imprégnation a d'abord lieu dans un bain d'oxyde de propylène/araldite 3:1 (une heure à 4°C), un autre d'oxyde de propylène/araldite 1:3 (une nuit à 4°C) et enfin de deux bains d'une heure dans de l'araldite. Au cours du dernier bain, l'araldite est dégazée sous vide dans une étuve à 45°C.

Enfin, les échantillons sont placés dans des moules alvéolaires remplis d'araldite. Les moules sont enfin mis à l'étuve à 60°C pendant 3 jours.

Ultramicrotomie – Les blocs ainsi moulés sont coupés en sections ultrafines de 70 nm à l'aide d'un ultramicrotome (Ultracut Reichert Young) qui sont déposées sur des grilles de cuivre.

Coloration – Les coupes ultrafines déposées sur grilles sont contrastées négativement à l'acide phosphotungstique dissout directement dans de l'eau distillée non tamponnée.

Observation – Les coupes ultrafines ont été observées avec un microscope électronique à transmission Philips CM12 sous une tension de 120 kV. Les micrographies ont été prises sur des plans films Kodak S0163, développés dans du révélateur D19 pur et numérisés avec une résolution de 1200 dpi avec un scanner de bureau.

1.3.4 Microscopie électronique à balayage

Quelques échantillons de gels fibrillaires ont été observés en microscopie électronique à balayage afin de compléter notre perception de ces matériaux.

Séchage supercritique – Cette méthode permet de sécher les échantillons tout en conservant au mieux leur structure tridimensionnelle.
Les échantillons de collagène fibrillé ont été fixés au glutaraldéhyde (tampon cacodylate 0,4 M, pH 7,4) pendant une heure à 4°C. Après rinçage dans du tampon cacodylate 0,1 M et du saccharose 0,6 M, les échantillons sont progressivement déshydratés dans des bains successifs de 5-10 minutes d'éthanol de degré croissant (60°, 70°, 80°, 90°, 95° et 100°). L'alcool absolu est alors remplacé sous 60 bars de pression par du dioxyde de carbone liquide, qui sera éliminé en chauffant jusqu'au point critique (31,1°C, 73,8 bars). L'appareil de séchage supercritique utilisé était un Bal-Tec 030.

Observations – Les échantillons ainsi séchés ont été recouverts d'une couche d'or de 2 nm d'épaisseur afin de les rendre conducteurs et d'empêcher ainsi l'accumulation des charges à leur surface, ce qui empêcherait de les imager. Les observations ont été effectuées sur un microscope JEOL JSM-5510 LV à une tension d'accélération de 10 kV. La distance échantillon-détecteur était de l'ordre de 12-15 mm.

Références du Chapitre 1

[1] Weiner S., Traub W., Wagner H.D. "Lamellar Bone: Structure-Function Relations" *J. Struct. Biol.* **126** (1999) 241-255

[2] Peterlik H., Roschger P., Klaushofer K., Fratzl P. "From Brittle to Ductile Fracture of Bone" *Nature Materials* **5** (2006) 52-55

[3] Silver F.H., Freeman J.W., Seehra G.P. "Collagen Self-Assembly and the Development of Tendon Mechanical Properties" *J. Biomech.* **36** (2003) 1529-1553

[4] Bloom W. et Fawcett D.W. "A Textbook of Histology" 9th Edition Philadelphia: W.B. Saunders Company (1968) 780

[5] van der Rest M. et Garonne R. "Collagen Family of Proteins" *FASEB J.* **5** (1992) 2814-2823

[6] Ricard-Blum S., Ruggiero F., van der Rest "The Collagen Superfamily" *Collagen Topics in Current Chemistry* **247** (2005) 35-84

[7] Prockop D.J. et Kiriviko K.I. "Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy" *Annu. Rev. Biochem.* **64** (1995) 403-434

[8] Kadler K.E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R.P. "Collagens at a Glance" *J. Cell Science* **120** (2007) 1955-1958

[9] van der Rest M. et Bruckner P. "Collagens: Diversity at the Molecular and Supramolecular and Supramolecular Levels" *Current Opinion in Structural Biology* **3**:3 (1993) 430-436

[10] Ottani V., Martini D., Franchi M., Ruggeri A., Raspanti M. "Hierarchical Structures in Fibrillar Collagens" *Micron* **33** (2002) 587-596

[11] Long C.G., Braswell E., Zhu D., Apigo J., Baum J., Brodski B. "Characterization of Collagen-like Peptides Containing Interruptions in the Repeating Gly-X-Y Sequence" *Biochemistry* **32**:43 11688-11695

[12] Bella J., Brodski B., Berman H.M. "Disrupted Collagen Architecture in the Crystal Structure of a Triple-Helical Peptide with a Gly→Ala Substitution" *Connect. Tissue Res.* **35**:1-4 (1996) 401-406

[13] Mottes M., Gomez Lira M., Zolezzi F., Valli M., Lisi V., Freising P. "Four New Cases of Lethal Osteogenesis Imperfecta due to Glycine Substitutions in COL1A1 and Genes" *Hum. Mutat.* **12**:1 (1998) 71-72

[14] Wenstrup R.J., Lever L.W., Phillips C.L., Quarles L.D. "Mutations in the COL1A2 Gene of Type I Collagen That Result in Nonlethal Forms of Osteogenesis Imperfecta" *Am. J. Med. Genet.* **45**:2 (2005) 228-232

[15] Olague-Marchan M., Twining S.S., Hacker M.K., McGrath J.A., Diaz L.A., Giudice G.J. "A Disease-associated Glycine Substitution in BP180 (type XVII) Leads to a Local Destabilization of the Major Collagen Triple Helix" *Matrix Biol.* **19** (2000) 223-233

[16] Ramachandran G.N. "Treatise on Collagen" vol 1 Academic Press New York (1967) 103-183

[17] Engel J. et Prockop D.J. "The Zipper-like Folding of Collagen Triple Helices and the Effects of Mutations that Disrupt the Zipper" *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20** (1991) 137-152

[18] van der Rest M., Dublet B., Labourdette L., Ricard-Blum S. "Mechanisms of Collagen Trimer Assembly" *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **111**:1 (1999) 105-113

[19] Schmitt F.O. "Interaction Properties of Elongate Protein Macromolecules with Particular Reference to Collagen (Tropocollagen)" *Reviews of Modern Physics* **31**:2 (1959) 349-358

[20] Gelse K., Pöschl E., T. Aigner "Collagens—Structure, Function, and Biosynthesis" *Advanced Drug Delivery Reviews* **55** (2003) 1531– 1546

[21] Uzawa K., Yeowell H.N., Yamamoto K., Mochida Y., Tanzawa H., Yamauchia M. "Lysine Hydroxylation of Collagen in a Fibroblast Cell Culture System" *Biochemical and Biophysical Research Communication* **305** (2003) 1531-1546

[22] Freudenberg U., Behrens S.H., Welzel P.B., Müller M., Grimmer M., Salchert K., Taeger T., Schmidt K., Pompe W., Werner C. "Electrostatic Interactions Modulate the Conformation of Collagen I" *Biophysical Journal* **92** (2007) 2108-2119

[23] Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen" *Biology of the Cell,* **67** (1989) 97-101

[24] Barrat J.-L. et Joanny J.-F. "Theory of Polyelectrolyte Solutions" *Advance in Chemical Physics* **94** (1996) 1-66

[25] Tang J. et Fraden S. "Nonmonotonic Temperature Dependence of the Flexibility of Bacteriophage fd" *Biopolymers* **39**:1 (1996) 13-22

[26] Claire K., Pecora R. "Translational and Rotational Dynamics of Collagen in Dilute Solution" *J. Phys. Chem.* **101** (1997) 746-753

[27] Saito, T., Iso N., Mizuno H., Onda N., Yamato H., Odashima, H. "Semiflexibility of Collagens in Solution" *Biopolymers* **21** (1982) 715-728

[28] Nestler F.H.M., Hvidt S., Ferry J. D, Veis A.D. "Flexibility of Collagen Determined from Dilute Solution Viscoelastic Masurements" *Biopolymers* **22** (1983) 1747-1758

[29] Utiyama H., Sakato K., Ikehara T., Setsuiye T., Kurata M. "Flexibility of Tropocollagen from Sedimentation and Viscosity" *Biopolymers* **12** (1973) 53-64

[30] Hofmann H., Voss T., Kühn K., Engel, J. "Localization of Flexible Sites in Thread-like Molecules from Electron Micrographs Comparison of Interstitial, Basement Membrane and Intima Collagens" *J. Mol. Biol.* **172** (1984) 325-343

[31] Sun Y.-L., Luo Z.-P., Fertala A., An K.-N., "Direct Quantification of the Flexibility of Type I Collagen Monomer" *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 295 (2002) 382-386

[32] Leikina E, Mertts M.V., Kuznetsova N., Leikin S. "Type I Collagen is Thermally Unstable at Body Temperature." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99** 3 (2002) 1314-1318

[33] Persikov A. V. et Brodsky B. "Unstable Molecules Form Stable Tissues" *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**:3 (2002) 1101–1103

[34] Shnyrov V.L., Lubsandorzhieva V.Ch., Zhadan G.G., Permyakov E.A. "Multi-stage Nature of the Thermal Denaturation Process in Collagen" *Biochemistry International* **26**:2 (1992) 211-217

[35] Papon P., Leblond J., Meijer P.H.E. "The Physics of Phase Transitions – Concept and Applications" Chapitre 6: Gelation and Transition in Biopolymers, Springer-Verlag (2002) p. 197

[36] Boedtker H. et Doty P. "A Study of Gelatin Molecules, Aggregates and Gels" *J. Phys. Chem.* **58** (1954) 968-983

[37] Rice R.V. "Reappearance of Certain Structural Features of Native Collagen after Thermal Transformation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **46** (1960) 1186-1194

[38] Djabourov M., Lechaire J.-P., Gaill F. "Structure and Rheology of Gelatin and Collagen Gels" *Biorheology* **30** (1993) 191-205

[39] Jackson D.S. et Fessler J.H. "Isolation and Properties of a Collagen Soluble in Salt Solution at Neutral pH" *Nature* **176** (1955) 69-70

[40] Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. "Preparation of Intact Monomeric Collagen from Rat Tail Tendon and Skin and the Structure of the Non-helical Ends in Solutions" *J. Biol. Chem.* **251** 19 (1976) 6062-6067

[41] Besseau L., Coulomb B., Godeau G., Lebreton-Decoster C., Giraud-Guille M.-M. "Production of Ordered Collagen Matrices for Three Dimensionnal Cell Culture" *Biomaterials* **23** (2002) 27-36

[42] Helary C. "Matrices Denses de Collagène pour l'Ingénierie Tissulaire : Structure et Colonisation par des Fibroblastes Dermiques Humains" Mémoire de diplôme d'ingénieur CNAM, Paris (2003)

[43] Deyl Z., Mikšík, Eckhardt A. "Preparative Procedures and Purity Assessment of Collagen Proteins" *Journal of Chromatography B* **790** (2003) 245-275

[44] Nishihara T. et Doty P. "The Sonic Fragmentation of Collagen Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (1958) 411-417

[45] Giraud-Guille M.-M., Besseau L., Herbage D., Gounon P. "Optimization of Collagen Liquid Crystalline Assemblies: Influence of Sonic Fragmentation" *J. Struct. Biol.* **113** (1994) 99-106

[46] Silver F.H. et Trelstad R.L. "Type I Collagen in Solution – Structure and Properties of Fibril Fragments" *J. Biol. Chem.* **255**:19 (1980) 9427-9433

[47] Yoshimura K., Terashima M., Hozan D., Shirai K. "Preparation and Dynamic Viscoelasticity Characterization of Alkali-Solubilized Collagen from Shark Skin" *J. Agric. Food Chem.* **48**:3 (2000) 685-690

[48] Laemmli, U.K. "Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of Bacteriophage T4" *Nature* **227** (1970) 680-685

[49] Bergman I. et Loxley R. "Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline" *R. Anal. Chem.* **35** (1963) 1961-1965

[50] Kale J. et Darwin J. "Modified Procedure for assay of H3- or C14-labeled Hydroxyproline" *Analytical Biochemistry* **15** (1965) 77-83

[51] Heaps P.W., Johnson P., Stainby G. "Partial Specific Wolumes of Solubilized Collagens and their Derived Gelatins" *Nature* **209** (1966) 397-398

[52] Christiansen et Cassel "Volume Change Accompanying Collagen Denaturation" *Biopolymers* **5** (1967) 685-689

[53] Nishihara T. et Doty P. "The Sonic Fragmentation of Collagen Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44** (1958) 411-417

[54] Komsa-Penkova R., Koynova R., Kostov G., Tenchov B. "Discrete Reduction of Type I Collagen Thermal Stability Upon Oxidation" *Biophysical Chemistry* **83** (1999) 185-195

Références citées: Majewska M.R., Dancewicz A.M. "Molecular Parameters of Radiation-induced Collagen Aggregates" *Stud. Biophys.* **63** (1977) 65-74

Rice R.V., Casassa E.F., Kerwin R.E., Maser M.D. "On the Length and Molecular Weight of Tropocollagen from Calf Skin" *Arch. Biochem. Biophys.* **105** (1964) 409-423

Young E.G., Lorimer J.W., "A Comparison of the Acid-Soluble Collagens From the Skin and Swim Bladder of the Cod" *Arch. Biochem. Biophys.* **92** (1961) 183-190

[55] Woodhead-Galloway J. "The Structure of the Collagen Fibril: An Interpretation (1982) *in*: Collagen in Health and Disease (1982) 28-48

[56] Bertrand L. et Roubaud M. "L'Emploi du Microscope Polarisant", Ed. Lemarre J., Paris (1969)

[57] Wolman M. et Kasten F.H. "Polarized Light Microscopy in the Study of the Molecular Structure of Collagen and Reticulin" *Histochemistry* **85** (1986) 41-49

[58] Narayanan T., Diat O., Bösecke P. "SAXS and USAXS on the High Brilliance Beamline at the ESRF" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **467-468** (2001) 1005-1009

[59] http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments/SCMatter/ID02/BeamlineLayout, dernière consultation le 12/06/2007.

ANNEXE 1 :
Protocole d'extraction du collagène de type I de tendons de queues de rat.

1. Prélèvement des tendons

- Extraction à partir de tendons de queue de rat (30 à 40 queues de rats). L'extraction se fait sous la hotte de la salle de culture.

- Matériel nécessaire
  - 2-3 litres de PBS
  - 1 bécher contenant ½ litre de NaCl 4M dans H_2O
  - pince coupe-ongle
  - ciseaux

- Technique
  - À l'aide de la pince coupe-ongles, serrer légèrement la queue à 1cm de son extrémité fine.
  - Casser la vertèbre par rotation du poignet (comme pour dénuder un fil électrique) et tirer pour sortir le tendon de la queue
  - Couper le tendon dénudé au-dessus d'un bécher de 500 ml de PBS
  - Recommencer l'opération de 1 cm en 1 cm. (Ne pas utiliser les 3 derniers centimètres de la base de la queue)

2. Lavage des tendons

- Laver ABONDAMMENT et plusieurs fois avec PBS, centrifugations successives 5mns / 1500 g. Le surnageant doit être limpide et incolore (→ pas de sang résiduel : donc pratiquement pas d'albumine).
- Rinçage des tendons dans du NaCl (dans eau distillée) à 4M (4M permet de retenir tout le collagène et éclatement de tout ce qui est cellulaire, notamment le sang, évacuation de l'albumine)
- Laver ABONDAMMENT et plusieurs fois les tendons, avec PBS, centrifugations successives / 5min / 1500 × *g*. (élimination du sel au maximum et tous les débris cellulaires)

3. Mise en solution du collagène

- Filtrer les tendons isolés sur une gaze stérile. Les peser. (NB : 10 queues de rats fournissent environ 1 gramme de tendon)
- Les mettre dans un bécher contenant du CH_3COOH 0,5 M (pH 2,5 équilibré avec HCl 1 N) stérile. NB : 30 grammes de tendons dans 2,5 litres qsp donnent une solution à 7 mg/ml. Ou bien : 1 litre pour 30 queues (beaucoup plus concentré)

- Mettre à agiter (dans la pièce à 20°C)
- Laisser le collagène se dissoudre pendant 24 h.
- Filtrage de la solution sur gaze. (Élimine les gros agrégats insolubles qui ne tombent pas à la centrifugation).

4. Purification du collagène

- Centrifugation du filtrat à 19000 rpm pendant 2 heures. (Élimine les gros agrégats non dissous)

- Précipitation du surnageant par NaCl 300 mM, centrifugation du filtrat à 19000 rpm pendant 3 heures. Conserver le surnageant et élimination du culot. (Élimine les éventuels contaminants qui auraient précipité par le sel jusqu'à 300mM)

- Précipitation du collagène par NaCl 600 mM

- Centrifugation à 5500 rpm pendant 45 minutes (10°C) (permet la récupération du collagène précipité et l'élimination des molécules encore présente en solution). Centrifuger jusqu'à ce qu'il soit limpide est qu'on n'obtienne plus de culot. Rassembler et peser les culots.

- Resolubilisation des culots dans CH_3COOH 0,5 M équilibré à pH 2.5 par HCl 1N. NB : 200 grammes de culots dans 1,8 litres qsp donnent une solution à 2-3 mg/ml.

- 4 dialyses successives contre du CH_3COOH 0,5 M, 1V dans 10V. (Attention pas de HCl ici. pH~3) (Elimination du sel et de HCl. Pour une précipitation à 500 mM on arrive à une concentration finale en sel de 50 μM).

- Transférer le contenu des boudins dans une bouteille stérile après la dialyse

- Centrifugation à 40000-50000 × *g* pendant 4 h, 15°C. (Élimination des agrégats non dissous)

5. Détermination de la concentration du collagène obtenu

Dosage d'hydroxyproline après hydrolyse du collagène ⇒ ANNEXE 2

6. Contrôle de la qualité du collagène obtenu

Electrophorèse ⇒ ANNEXE 3

EXTRACTION DE COLLAGENE DE TYPE I : SOLUTIONS

Stériliser les solutions

<u>CH_3COOH 0,5M</u> :

Stériliser 1h30

- CH_3COOH purex (17,5 M) 58 ml
- H_2O distillée qsp 2000 ml

<u>PBS 10×</u> :

- NaCl : 80 g
- KCl : 2 g
- Na_2HPO_4, 12 H_2O 28,9 g
- NaH2PO_4, 1 H_2O 2,027 g
- H2O distillée qsp 1000 ml

ANNEXE 2 :
Protocole de dosage de l'hydroxyproline.

1. Hydrolyse des échantillons

Pour une solution diluée :

1. Prélever 50 µl de solution à la propipette ; peser précisément le volume effectivement mis à hydrolyser dans l'eppendorf.
2. Hydrolyser avec 50 µl d'acide chlorhydrique 6 N. Vortexer, centrifuger et placer l'eppendorf hermétiquement fermé dans une étude à 106°C pendant la nuit.

Pour une solution concentrée :

1. Prélever à la spatule ~10 mg de solution et peser précisément.
2. Hydrolyser avec 50 µl d'acide chlorhydrique 6 N. Vortexer, centrifuger et placer l'eppendorf hermétiquement fermé dans une étude à 106°C pendant la nuit.

3. Evaporation du solvant sous vide au Speedvac

Utilisation du Speedvac :

- Mettre de l'azote liquide autour du piège à vapeurs (pour les condenser). Boucher.
- Mettre les tubes ouverts dans la centrifugeuse.
- Raccorder le tuyau de la pompe au Speedvac.
- Régler en position "High".
- Mettre en route le moteur.
- Laisser jusqu'à ce que les tubes soient secs (40 min à 1h).

2. Dosage de l'hydroxyproline

1. Reprendre les échantillons secs avec 1 ml d'eau distillée. Vortexer.
2. Dosage

	Gamme d'hydroxyproline à partir d'une solution mère à 20µg/ml					**Echantillon collagène**		
Hydroxyproline ou échantillons (µl)	0 0µg/ml	40 0,8 µg/ml	80 1,6 µg/ml	100 2 µg/ml	140 2,8 µg/ml	10	20	40
H2O (µl)	400	360	320	300	260	390	380	360
Dilution de l'échantillon						1/40	1/20	1/10
Chloramine T	200 µl à température ambiante pendant 20 min. Vortexer.							
Acide perchlorique 3,15M	200 µl à température ambiante pendant 5 min. Vortexer.							
DMBA	200 µl, 20min à 60°C. Vortexer.							

Mettre 5 mn à 4°C.

3. Lecture de la densité optique à 557 nm sur un spectromètre UV-visible « Ultrospec 1100 Pro (Amersham Biosciences).

3. Calcul de la concentration en collagène

Concentration de collagène en mg/ml = quantité de proline OH/µg échantillon × facteur de dilution × 7,6 .

× 7,6 car il y a 13% d'hydroxyproline dans une molécule de collagène.

Le facteur de dilution tient compte :

- du volume de l'échantillon dilué dosé
- de la reprise de l'extrait du collagène sec dans 1 ml d'H_2O diluée.
- De la quantité de collagène hydrolysée.

DOSAGE DE L'HYDROXYPROLINE – RÉACTIFS

1. Tampon de dosage

- Acide citrique monohydraté	(0,25 M)	6,25 g
- Acétate de sodium trihydraté	(1 M)	17,5 g
- Hydroxyde de sodium	(0,85 M)	4,25 g
- Acide acétique Purex		1,5 ml
- H_2O		qsp 125 ml

Ajuster le pH à 6 avec de l'acide acétique Purex
Conserver à 4°C

2. Acide Perchlorique 3,15M

- Acide Perchlorique 65%	(10,39 M)	30 ml
- H_2O distillée		70 ml

Conserver à 4°C

3. Hydroxyproline standard (20µg/ml)

- solution mère :
  - Hydroxy-L-Proline 20 mg
  - H_2O distillée 100 ml
- solution de dosage :
  - solution mère diluée au 1/10

4. Solution de Chloramine T

- Chloramine T	400 mg
- H_2O distillée	5 ml
- Méthyl Cellosolve (Éther monoéthylique de l'éthylène glycol)	7,5 ml
- Tampon de dosage	12,5 ml

5. Solution de DMBA

- DMBA (Diméthylamino-4 benzaldéhyde)	1 g
- Méthyl Cellosolve	5 ml

Toutes les solutions sauf l'acide Perchlorique sont à préparer extemporanément.

ANNEXE 3:
Protocole de préparation des gels d'électrophorèse.

1. Préparation des gels

Gel de migration : 10% 2 gels = 20 ml

H_2O distillée	8,1 ml
Tris HCl 1,5M, pH = 8,8	5 ml
Acrylamide/Bis 30%	6,6 ml
SDS 10%	200 µl
Persulfate d'ammonium 10%	100 µl
Temed (à ajouter au moment de l'emploi du gel)	10 µl

Gel de concentration : 5% 2 gels = 10 ml

H_2O distillée	5,7 ml
Tris HCl 0,5M ; pH = 6,8	2,5 ml
Acrylamide/Bis 30%	1,7 ml
SDS 10%	100 µl
Persulfate d'ammonium 10%	50 µl
Temed (à ajouter au moment de l'emploi du gel)	10 µl

2. Préparation des plaques - Montage

- Laver soigneusement à l'alcool une plaque support en verre et une plaque fine en verre par gel. Sécher
- Installer les plaques sur le support de montage. Vérifier l'étanchéité avec H_2O distillée
- Remplir de gel de migration jusqu'à 4-5mm de la ligne verte inférieure (Pipetboy +pipette de 10ml)
- Ajouter doucement H_2O distillée jusqu'en haut des plaques (à la pipette automatique de 1ml)
- Attendre la polymérisation du gel
- Vider par retournement l'H_2O au-dessus du gel
- Ajouter le gel de concentration (pipette automatique de 1ml) jusqu'à 2-3mm du bord supérieur
- Mettre un peigne 10 puits. Laisser polymériser

3. Préparation de la cuve à électrophorèse

- Placer la cuve dans un plateau rempli de glace
- Transférer les montages sur le support prévu pour l'électrophorèse, petite plaque vers l'intérieur (impératif). Mettre le support dans la cuve
- Remplir de Tampon de migration 1X jusqu'au ras des plaques

4. Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons à doser au ½ dans le Tampon d'échantillon (Généralement 10µl d'échantillon + 10µl de Tampon)
- Pour les échantillons de collagène : Evaporation à sec au Speedvac en position médium, puis reprise dans le Tampon d'échantillon

5. Dépôt des échantillons

- Déposer les échantillons dans les puits
- Réserver un puits par plaque pour le marqueur de Poids Moléculaires (Rainbowmix, code RPN756)

6. Migration

- Recouvrir la cuve de son couvercle en respectant les polarités
- Relier les électrodes à l'appareil
- Migration en 2 temps :

1 - Régler l'appareil sur 80 volts. Mettre en marche (l'apparition de petites bulles dans le Tampon de migration indique que le courant passe)
- Laisser 10 à 20mn, jusqu'à ce que les dépôts soient compactés en une seule ligne (les protéines ont alors atteint le front du gel de séparation)

2 - Régler l'appareil sur 160 volts pour la migration proprement dite
- Arrêter quand toutes les protéines ont complètement migré

7. Démontage

- Retirer les plaques du support
- Marquer le front de migration
- Sur un transparent, à l'aide du négatoscope, décalquer le gel et reporter :
  a) le front de migration
  b) la distance de migration des différentes protéines du marqueur de poids moléculaires

8. Coloration

- Démouler les gels
- Mettre chaque gel dans une boite plastique avec couvercle
- Ajouter 50 à 100 ml de Bleu de Coomassie
- Agiter pendant 1 heure – vitesse 40
- Jeter le Bleu de Coomassie

9. Décoloration

Au décolorant rapide

- Ajouter 50 à 100ml de décolorant rapide
- Agiter 1 Heure – vitesse 40
- Jeter le décolorant

Au décolorant de conservation

- Ajouter 50 à 100ml de décolorant de conservation
- Agiter 1 nuit – vitesse 40
- Jeter le décolorant

10. Réhydratation

- Ajouter 50 à 100ml H_2O distillée pour réhydrater le gel (qui s'est rétracté car les décolorants contiennent de l'alcool, d'où déshydratation)

11. Résultats

- Scanner le gel
- Mesurer les distances de migration des protéines du marqueur de Poids moléculaires → Courbe d'étalonnage
- Détermination du Poids moléculaire des protéines contenues dans l'échantillon sur la courbe d'étalonnage

ELECTROPHORÈSE – RÉACTIFS

1. Tris-HCl 1,5M pH=8,8

Pour 100ml de solution :

- Tris Amino	18,171 g
-H_2O distillée	70 ml

• Mesurer le pH
• Ajuster à pH 8,8 avec HCl 35%
• Ajouter H_2O distillée qsp 100ml

2. Tris-HCl 0,5M pH=6,8

Pour 100ml de solution :

- Tris Amino	6,057 g
-H_2O distillée	70 ml

• Mesurer le pH
• Ajuster à pH 6,8 avec HCl 35%
• Ajouter H_2O distillée qsp 100ml

3. SDS 10%

- SDS	10 g
- H_2O distillée qsp	100 ml

4. Persulfate d'ammonium 10%

- Persulfate d'ammonium	500 mg
- H_2O distillée	5 ml

5. Acrylamide Bis 30%

- Solution prête à l'emploi (réfrigérateur)

6. Temed

- Solution prête à l'emploi

7. Tampon d'échantillon
   - Tris- HCl 0,5M pH 6,8 1,25 ml
   - β Mercapto Ethanol 0,45 ml
   - SDS 10% 2 ml
   - Bleu de Bromophénol 0,05% (p/v)
   - Glycérol 1 ml
   - EDTA 3,72 mg
   - H_2O distillée qsp 5 ml

8. Tampon de migration 10×
   - Tris 30 g
   - SDS 10 g
   - Glycine 144 g
   - H_2O distillée qsp 1000 ml

9. Tampon de migration 1×
   - Tampon de migration 10× dilué $^1/_{10}$

10. Bleu de Coomassie
   - Solution prête à l'emploi

11. Décolorant rapide
   - Ethanol 400 ml
   - H_2O distillée 500 ml
   - CH_3COOH 100 ml

12. Décolorant de conservation
   - Ethanol 100 ml
   - H_2O distillée 825 ml
   - CH_3COOH 75 ml

ANNEXE 4 :
Protocole de fixation pour la microscopie électronique.

Se fait dans des salières en verre :

- plusieurs petits échantillons

1. **1ère fixation : glutaraldéhyde**
   - Préparer une solution de glutaraldéhyde :
     - glutaraldéhyde à 8% 1 ml
     - Tampon Caco 0,05M - pH 7,4 2,2 ml
   - Ajouter ≈ 1ml de solution de glutaraldéhyde dans chaque salière
   - Laisser 1 heure à 4°C
   - Effectuer 3 lavages successifs de 10 mn avec un mélange :
     - 1 vol. Tampon Caco 0,1M - pH 7,4
     - 1 vol. saccharose 0,6M

2. **2ème fixation : osmium**
   - Préparer une solution d'Osmium :
     - Osmium tétraoxyde 4% 1 vol.
     - H_2O distillée 1 vol.
   - Ajouter ≈ 1ml de solution d'Osmium dans les salières
   - Laisser 1 heure à 4°C
   - Effectuer 3 lavages successifs de 10 mn avec H_2O distillée

3. **Déshydratation**
   - Alcool 50° 5 mn
   - Alcool 70° 5 mn

   (Il est possible d'arrêter à cette étape ; mettre alors les salières à 4°C)
   - Alcool 95° 5 mn
   - Alcool 100° 2 x 10 mn

     (2 passages successifs de 10 mn)
   - Alcool 100° 1 vol. + Oxyde de propylène 1 vol. 10 mn
   - Oxyde de propylène 10 mn

4. **Imprégnation**
   - Préparer une solution d'Araldite
     - Araldite CY212 20 ml
     - DDSA = durcisseur 22 ml
     - BDMA = accélérateur 1,1 ml
   - Oxyde de propylène ¾ vol. + Araldite ¼ vol. 60 mn
   - Oxyde de propylène ¼ vol. + Araldite ¾ 1 nuit à 4°C
   - Changer les échantillons de salières
   - Araldite 1 heure
   - Changer les échantillons de salières
   - Remettre de l'Araldite ¾ heure à 1 heure en dégazant sous vide dans l'étuve spéciale (tous les réglages de l'étuve sont pré- effectués ; en principe l'étuve est toujours allumée)

Dégazage : - Fermer l'air sous la paillasse
- Mettre en marche le moteur
- Ouvrir le vide ; laisser la pression monter jusque p = 30, des bulles se forment dans la résine; quand il y a trop de bulles, rouvrir l'air, fermer le vide. Recommencer ces opérations jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de bulles. Laisser les salières dans l'étuve, vide ouvert, jusqu'à la fin de l'imprégnation

5. Inclusion

- Se fait dans une plaque à inclusion
- Remplir presque complètement les alvéoles de solution d'Araldite (la même solution que celle préparée pour l'imprégnation)
- Placer l'échantillon au sommet de l'alvéole en le centrant bien
- Finir de remplir l'alvéole de solution d'Araldite à l'aide d'une petite seringue
- Mettre à l'étuve à 60°C pendant 3 jours
  (le reste de la solution d'Araldite est conservé au congélateur dans une grosse seringue

Chapitre 2

Etude de la transition isotrope/cholestérique dans les solutions denses de collagène

Kamil smiled as you smiled at a child who plays with his toys while,
in the hospital, one of its parents is dying.
- Philip Roth[*]

Dans ce chapitre, après avoir présenté brièvement les cristaux liquides (notamment d'origine biologique) et une première approche théorique de la transition isotrope/nématique *via* la théorie d'Onsager, nous rapportons les résultats obtenus avec des solutions acides concentrées de collagène. Nous nous sommes attachés à considérer des solutions denses de part et d'autre de la transition isotrope/nématique en contrôlant autant que possible la concentration, le pH et la force ionique. L'analyse des textures en microscopie optique à lumière polarisée nous a permis de vérifier la nature cholestérique des phases denses de collagène, mais aussi de déterminer les concentrations critiques de transition à différentes forces ioniques. La diffusion des rayons X aux petits angles nous a permis de sonder la structure microscopique des solutions. Nous avons pu estimer le paramètre d'ordre de la phase nématique, établir une loi de dilution et étudier l'alignement sous cisaillement de solutions isotropes ou anisotropes. Ces données expérimentales ont enfin été comparées aux prédictions de Chen basées sur la théorie de Khokhlov et Semenov pour la transition isotrope/nématique avec des molécules semi-flexibles.

[*] "Operation Shylock" (Vintage International, 1994)

2.1 Le collagène : un exemple de cristal liquide lyotrope

2.1.1 Généralités sur les cristaux liquides

Les cristaux liquides constituent un état de la matière à mi-chemin entre les cristaux moléculaires solides, dans lesquels il existe un ordre positionnel et orientationnel à longue portée bien défini, et les liquides désordonnés (Figure 1). Les premiers cristaux liquides découverts ont été étudiés par Reinitzer dès 1888. Celui-ci étudiait des cristaux de benzoate de cholestérol qui ont la propriété de fondre à 145,5°C pour donner un fluide laiteux se clarifiant à 178,5°C. À la même époque, le physicien Otto Lehmann, cristallographe, développe le microscope à lumière polarisée avec une platine chauffante. Reinitzer lui écrit le 14 Mars 1888 pour lui décrire cette propriété surprenante du benzoate de cholestérol. Lehmann donnera à ces substances l'appelation générique de « cristaux coulants » en 1889, « liquides cristallins » en 1890 et enfin de « cristaux liquides » en 1900.

Les cristaux liquides peuvent se classer en deux catégories : les thermotropes et les lyotropes. Pour les premiers, le paramètre pertinent de la mise en ordre est la température. Il existe alors une température critique en dessous de laquelle la phase est ordonnée, et au-dessus de laquelle elle est désorganisée. On parle alors de phase isotrope. La phase cristal-liquide constitue, lorsqu'elle existe, une phase intermédiaire entre la phase liquide et la phase solide cristalline. Cette phase est thermodynamiquement stable sur une certaine gamme de température. Pour les cristaux liquides lyotropes, l'organisation a lieu sous l'influence du solvant. Le paramètre pertinent est alors la concentration en soluté. Éventuellement, certaines molécules réagissent à ces deux paramètres ; on parle alors de cristal liquide amphotrope. Dans le cas des mésophases lyotropes, les particules nématogènes peuvent aussi bien être minérales[1], comme les argiles[2,3] que de nature organique. En fait, la possibilité de former une mésophase lyotrope est essentiellement gouvernée par la forme des colloïdes : l'anisotropie de la phase est le reflet de l'anisotropie de forme des molécules. Les géométries les plus souvent rencontrées sont oblongues ou discoïdes.

La structure particulière des cristaux liquides leur confère notamment des propriétés optiques et rhéologiques originales, dont certaines seront illustrées par le cas du collagène. Il existe dans le domaine des cristaux liquides un grand nombre d'ouvrages de références et de revues générales : P.-G. De Gennes[4], M. Kléman & O.D. Lavrentovitch[5], M. Mitov[6], P.J. Collings[7]...

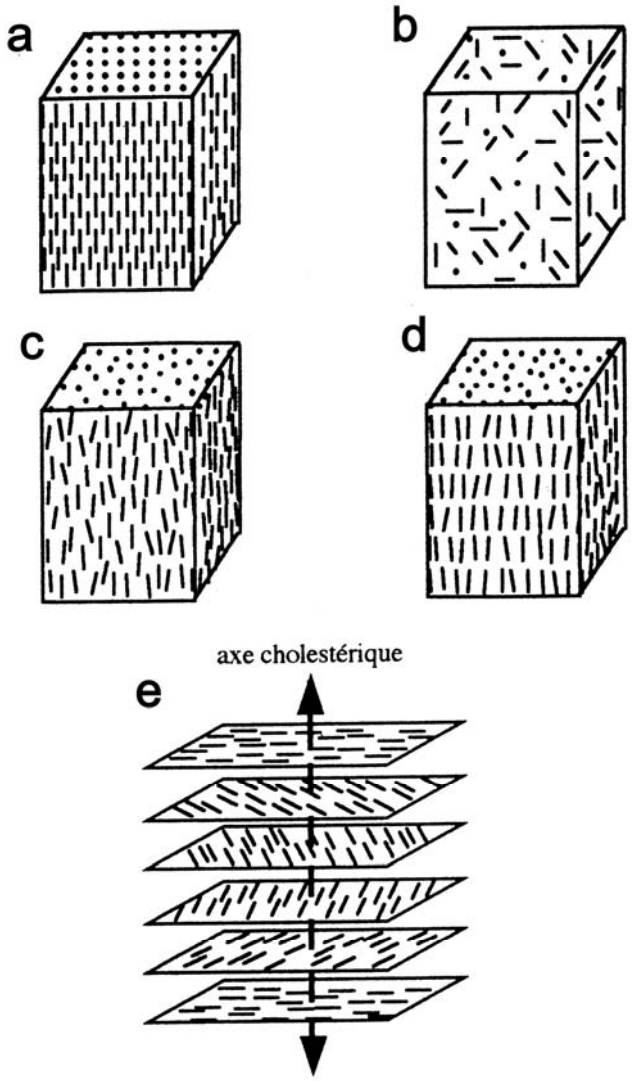


Figure 1 : Représentation schématique (a) d'un cristal solide, (b) d'un liquide (ou phase isotrope), (c) d'un cristal liquide de type nématique, (d) d'un cristal liquide de type smectique A et (e) d'un cristal liquide de type cholestérique. Dans ce dernier cas les plans représentés sont des plans virtuels ; en réalité l'orientation des molécules tourne continûment autour de l'axe cholestérique. (D'après Y. Bouligand/R. Martin[8])

2.1.2 Macromolécules biologiques formant des phases cristal liquides

Parmi les molécules ou particules nématogènes, certaines sont des macromolécules d'origines biologiques, ou des assemblages supramoléculaires de protéines ou de polysaccharides. Outre dans les suspensions le collagène, des phases cristal-liquides ont été observées dans des suspensions d'ADN[9,10], de chitine[11,12], de cellulose[13], d'actine[14-16], de virus de la mosaïque du tabac[17,18] et du bactériophage fd[19,20] pour ne citer que quelques exemples significatifs. Les virus constituent d'ailleurs d'excellents systèmes modèles. En effet, ils sont relativement faciles à produire, sont remarquablement monodisperses, et les transitions ne sont pas masquées par la gélification des solutions. Par ailleurs, ils sont génétiquement modifiables, ce qui permet de tester

l'influence de différents paramètres, notamment géométriques, sur le diagramme de phase de solutions de bâtonnets[21- 24.]

Il faut bien sûr aussi citer les phospholipides, dont l'assemblage en bicouche est un parfait exemple de phase lamellaire (ou smectique, voir Figure 1d). Ces bicouches lipidiques constituent des membranes plasmiques et nucléaires, la myéline de cellules neurales et la membrane tylakoïde des chloroplastes.

En ce qui concerne le collagène, les premières références aux phases cristal-liquides dans l'étude du collagène étaient essentiellement fondées sur une analogie entre l'architecture formée par les fibres de collagènes dans des tissus tels que les os ou les tendons et les organisations moléculaires observées dans certains cristaux liquides[25]. Étant donnée la forme anisotrope et hélicoïdale de la molécule de collagène, il était en effet plausible que de telles mésophases puissent exister. C'est en concentrant des solutions de collagène soluble qu'il a été possible de caractériser progressivement leurs propriétés de cristaux liquides. En 1984, Murthy[26] observe la biréfringence de solutions de collagène à pH acide pour des concentrations supérieures à 9% en poids. Il montre également qu'il arrive en partie à aligner partiellement des fibrilles de collagène formées dans un champ magnétique à partir de solutions diluées. Par la suite M.-M. Giraud-Guille[27,28] démontrera que des solutions concentrées de collagène obtenues par évaporation lente entre lame et lamelle produisent des textures similaires à celles des cristaux liquides cholestériques thermotropes.

L'étude des cristaux liquides d'origine biologique est particulièrement stimulante, puisqu'elle soulève notamment la question de la morphogenèse des tissus[29,30] et de la relation entre leur organisation et leurs propriétés, notamment mécaniques, mais aussi optiques et de transport.

2.1.3 Aperçu théorique de la transition isotrope/nématique : physique statistique

Dans notre cas, les molécules de collagène sont des molécules allongées, qui peuvent être modélisées par des bâtonnets semi-rigides. Historiquement, Lars Onsager a été le premier à proposer une théorie sur l'organisation de particules rigides anisotropes. En 1949[31], il montre que la répulsion de cœur dur entre particules anisotropes suffit à produire une phase nématique stable. Une phase nématique est définie par un ordre orientationnel à longue distance et un ordre positionnel local (Figure 1c).

La phase cholestérique, comme celle observée dans les solutions de collagène n'est en fait qu'une déformation sous une contrainte de torsion intrinsèque d'une phase nématique (Figure 1e). Dans la suite, nous ne distinguerons pas les deux termes et considérerons la phase cholestérique, ou nématique chirale, comme une simple phase nématique. Du point de vue thermodynamique, elle ne constitue d'ailleurs pas une autre phase. Il n'existe donc pas de transition de phases nématique/cholestérique. Les raisons qui conduisent à former des phases cholestériques dans les assemblées de collagène, d'ADN ou de virus[32,33] sont en revanche beaucoup plus difficiles à modéliser[33- 39]. L'hélicité de ces molécules en est évidemment à l'origine, même si les raisons profondes en sont toujours débattues. En effet, à ce jour, peu de théories sont capables de prédire à coup sûr le pas et le sens de l'hélicité de la mésophase à partir de la structure de la molécule.

Pour sa démonstration, Onsager applique des principes de physique statistique à une assemblée de N cylindres rigides de longueur L et de diamètre D avec pour seules hypothèses[31,40] :

i) Les forces les plus significatives correspondent aux répulsions stériques de cœurs durs. Les cylindres ne peuvent donc pas s'interpénétrer.

ii) La fraction volumique $\Phi = c\,¼\pi LD^2$ est très inférieure à 1.

iii) Les cylindres sont très longs ($L >> D$).

Il part de l'expression classique de l'énergie libre d'un gaz dilué de sphères dures (concentration c, rayon r, $cr << 1$) :

$$F = F_0 + k_B T \quad (\log c + \frac{1}{2} c\beta_1) + O(c^2) \qquad \textbf{(1)}$$

où β_1 est le volume exclu (Cf. Figure 2) et F_0 correspond à l'énergie de la phase isotrope.
Pour tenir compte de l'anisotropie des particules, il faut introduire la fonction de distribution angulaire des cylindres, $f_{\mathbf{a}}$. On a alors $(cf_{\mathbf{a}}\,\mathrm{d}\Omega)$ le nombre de cylindres par unité de volume pointant dans un petit angle solide dΩ suivant la direction du vecteur **a**. L'énergie libre s'exprime donc ainsi :

$$F = F_0 + k_B T\left(\int f_{\mathbf{a}} \log(4\pi f_a c)\,\mathrm{d}\Omega + \frac{1}{2} c \int f_{\mathbf{a}} f_{\mathbf{a'}} \beta_1(\mathbf{aa'})\,\mathrm{d}\Omega\,\mathrm{d}\Omega'\right) + O(c^2) \qquad \textbf{(2)}$$

Le deuxième terme de l'équation (2) décrit la perte d'entropie associée à l'alignement moléculaire. Le troisième terme décrit les effets de volumes exclus et correspond à l'entropie de mélange ;

$\beta_1(\mathbf{aa'})$ est le volume exclu par un cylindre orienté suivant **a** tel que le voit un second cylindre orienté dans la direction **a'** (Figure 2). Le volume exclu s'exprime de la manière suivante :

$$\beta_1 = 2L^2 D|\sin\gamma| \qquad \textbf{(3)}$$

Où γ est l'angle entre **a** et **a'**. La transition isotrope/nématique résulte donc de la compétition entre deux types d'entropie. À des faibles concentrations, l'entropie orientationnelle l'emporte et est maximisée par une distribution isotrope des particules. À des concentrations plus élevées, l'entropie de compaction (ou de mélange) devient plus importante et favorise une distribution nématique.

La minimisation de l'énergie libre F (Equation 1) conduit à une transition de phase du premier ordre depuis une phase isotrope vers une phase anisotrope. La résolution numérique à l'aide de fonctions d'essai donne alors les concentrations de limite de métastabilité de la phase nématique C_i et de la phase isotrope C_n [31] :

$$\frac{\pi}{4}\frac{N_a L^2 D}{M}.C_i = 3{,}3399 \qquad \text{et} \qquad \frac{\pi}{4}\frac{N_a L^2 D}{M}.C_n = 4{,}4858 \qquad \textbf{(4)}$$

Soit, dans notre cas, avec L = 300 nm, D = 1,5 nm et M = 300 kD :

C_i = 15,69 mg/ml

C_n = 21,08 mg/ml

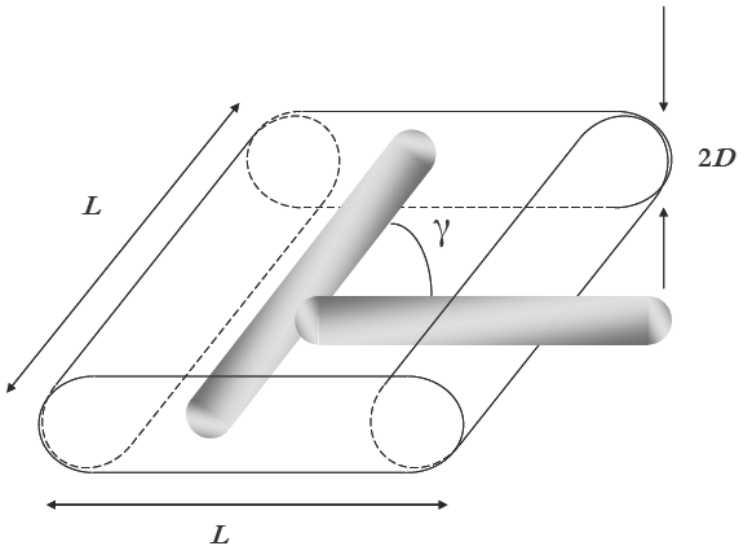


Figure 2 : Volume exclu pour deux sphérocylindres. Le volume exclu pour un deuxième sphérocylindre par la présence d'un premier dépend de l'angle γ entre les deux. Schéma adapté de Vroege et Lekkekkerker.

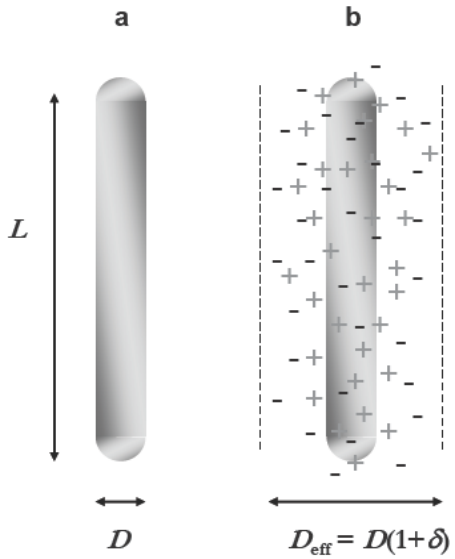


Figure 3 : Diamètre effectif. Dans un solvant polaire, le diamètre géométrique D d'un sphérocylindre est augmenté d'une valeur δD par la double couche ionique qui l'entoure, ce qui a pour effet d'augmenter le volume exclu des particules et de réduire l'entropie de mélange.

En réalité, les particules n'interagissent pas seulement par répulsion stérique. Si elles sont chargées, il faut aussi prendre en compte les répulsions électrostatiques. Celles-ci ont trois effets :

- La double couche d'ions va avoir pour effet de modifier le diamètre apparent des molécules. On ne peut donc plus seulement considérer le diamètre géométrique des particules (D). On calcule alors un diamètre effectif $D_{eff} = D(1+\delta)$ (Figure 3). L'augmentation apparente du diamètre des particules va avoir pour effet de déplacer la transition isotrope/anisotrope vers des plus faibles fractions volumiques par rapport au cas où seules les répulsions de cœurs durs sont considérées.
- La double couche d'ions a aussi pour effet de réduire l'anisotropie des particules puisque $L_{eff}/D_{eff} < L/D$. Cet effet a un sens opposé au précédent ; cependant nous constaterons que son influence est largement surpassée par l'augmentation du volume exclu.
- D'autre part, les répulsions électrostatiques à grande portée entre surfaces chargées de même signe favorisent une orientation perpendiculaire des particules les unes par rapport aux autres, ce qui contribue à déstabiliser la phase anisotrope. Stroobants *et al.*[41] prennent donc en compte un effet de torsion† en introduisant le paramètre $h = (\varkappa D_{eff})^{-1}$, où $\varkappa$ est l'inverse de la longueur de Debye. En pratique, sa valeur est rarement élevée et après avoir vérifié sa faible influence pour le système étudié (car $\varkappa^{-1} \sim D_{eff}$), nous le négligerons dans nos calculs.

† Cet effet de torsion est bien entendu indépendant de la torsion induite par une éventuelle hélicité des particules qui, elle, a pour effet de produire une phase cholestérique.

L'enjeu de la théorie d'Onsager et de ses extensions est de décrire la transition de phase isotrope/nématique en termes de concentrations à l'équilibre et de paramètre d'ordre. Ici, la transition de phase prévue est du 1er ordre. Il doit donc exister une gamme de concentrations dans laquelle coexistent la phase isotrope et la phase anisotrope. Ce domaine biphasique est délimité par deux concentrations critiques : C_i et C_n, les concentrations à coexistence respectivement de la phase isotrope et de la phase nématique‡. Quant au paramètre d'ordre nématique, il correspond au second moment de la fonction de distribution orientationnelle et s'exprime comme suit :

$$S = 2\pi \int_0^{\pi} \left(\frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right) f(\theta) \, \mathrm{d} \cos\theta \qquad \textbf{(5)}$$

Où θ est la déviation d'orientation d'un cylindre par rapport au directeur n. L'équation (5) correspond donc à la moyenne des orientations de chacune des molécules dans la solution. On trouve alors un paramètre d'ordre nul dans une phase isotrope et égal à 1 pour une phase de bâtonnets parfaitement alignés avec le directeur n ($\theta = 0$ pour toutes les molécules).

Nous reviendrons plus en détail sur certains modèles théoriques de la transition isotrope/nématique après avoir présenté nos résultats.

2.2 Résultats

2.2.1 Textures et séquences de phases

Une première approche dans la détection et l'identification des phases cristal liquides consiste en l'observation des échantillons par microscopie optique entre polariseurs croisés. Placée entre deux polariseurs croisés (polariseur P et analyseur A), une solution isotrope ne modifie pas le trajet de la lumière et l'échantillon apparaît sombre. La lumière, polarisée par P, est éteinte par A. En revanche, dès qu'une solution présente une certaine anisotropie, elle va présenter de la biréfringence : en modifiant la polarisation de la lumière, le faisceau lumineux transmis par la solution ne sera pas complètement éteint par A et la solution apparaîtra lumineuse. L'effet de la biréfringence (différence de chemin optique pour un monodomaine) sera proportionnel à la distance parcourue dans la solution anisotrope. De plus, si l'on observe l'échantillon sur une épaisseur suffisamment fine, on observera des textures caractéristiques de l'organisation des molécules à l'intérieur des mésophases.

‡ C_i est aussi appelée concentration limite de métastabilité de la phase nématique.

L'observation au microscope à lumière polarisée de solutions diluées de collagène concentrées par évaporation entre une lame et une lamelle de microscope a permis d'identifier des textures dites « en empreintes digitales » dans un gradient de concentration[27,28]. Ces dernières apparaissent à proximité plus ou moins immédiate de l'interface avec l'air. Ces textures sont dessinées par une alternance de bandes claires et de bandes sombres suivant des motifs rappelant des empreintes digitales. Elles sont caractéristiques d'une phase cholestérique, dans laquelle les molécules sont organisées de façon hélicoïdale. En effet, si l'axe cholestérique n'est pas parallèle à l'un des polariseurs ou à l'axe optique, un faisceau lumineux polarisé « rencontre » alternativement des molécules de profil, donc anisotropes (ce qui correspond aux bandes claires) et des molécules de face, donc isotropes selon l'axe optique (ce qui correspond aux bandes sombres).

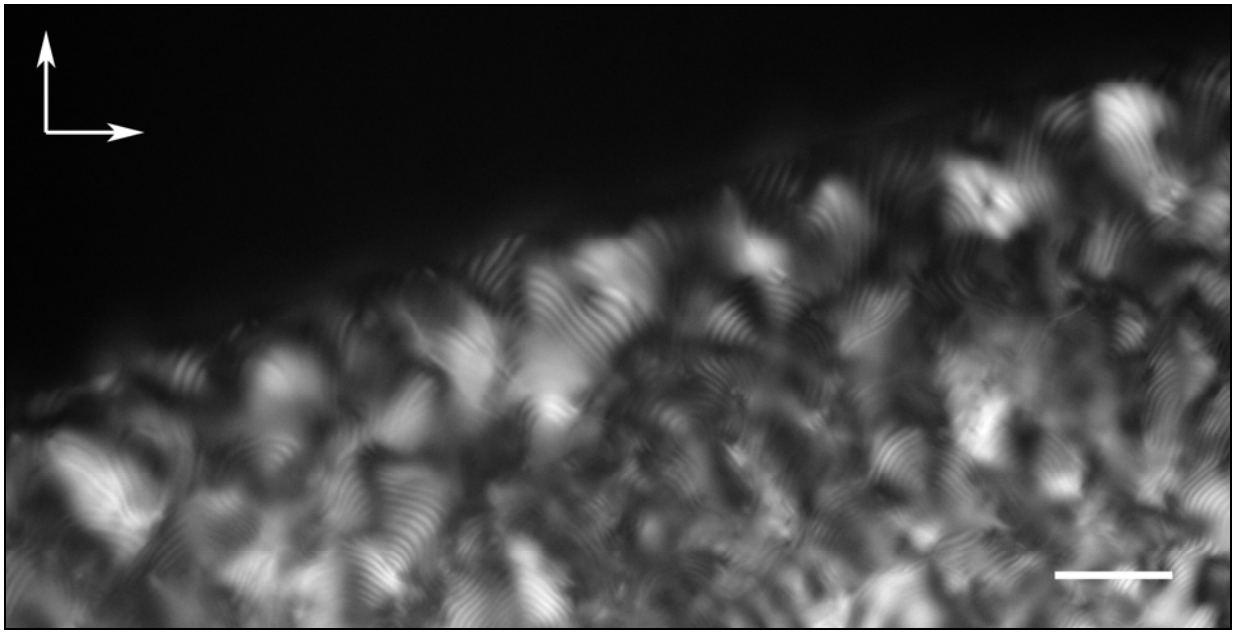


Figure 4 : Solution de collagène concentrée (non soniquée) dans une microchambre observée en microscopie optique entre polariseurs croisés. En haut, la phase isotrope donnant lieu à une extinction complète de la lumière. En dessous, des textures en « empreintes digitales » dues à la présence de nombreux domaines cholestériques. Barre d'échelle = 30 µm.

Plus récemment, ce montage expérimental a été amélioré en utilisant des chambres de verre approvisionnées en continu en solution diluée de collagène par un pousse-seringue et présentant une interface air/solution par laquelle le solvant s'évapore[42]. Ce système a permis de stabiliser un large gradient de concentration allant de la solution diluée à des phases très denses, de l'ordre de 1000 mg/ml. L'observation de ce gradient a permis d'isoler des gouttelettes (sphérulites, ou encore tactoïdes) de phase cholestérique au sein de la phase isotrope (Figure 5).

Cette coexistence des deux phases (à la transition) est l'un des critères permettant d'identifier cette transition de phase isotrope/cholestérique comme étant du premier ordre[§].

Il est important de noter que dans ces expériences précurseurs, les solutions de collagène utilisées avaient été soumises à un traitement aux ultrasons afin de disperser d'éventuels agrégats persistant après les étapes de purification. Il a été montré dans le groupe que la sonication peut aussi avoir pour effet de casser les molécules de collagène[43,44]. Afin d'éviter cela et de conserver une population la plus monodisperse possible, nous avons décidé de supprimer cette étape dans notre protocole (Cf. § 1.2.1). Nous reviendrons plus loin sur les conséquences de cette modification du protocole habituel.

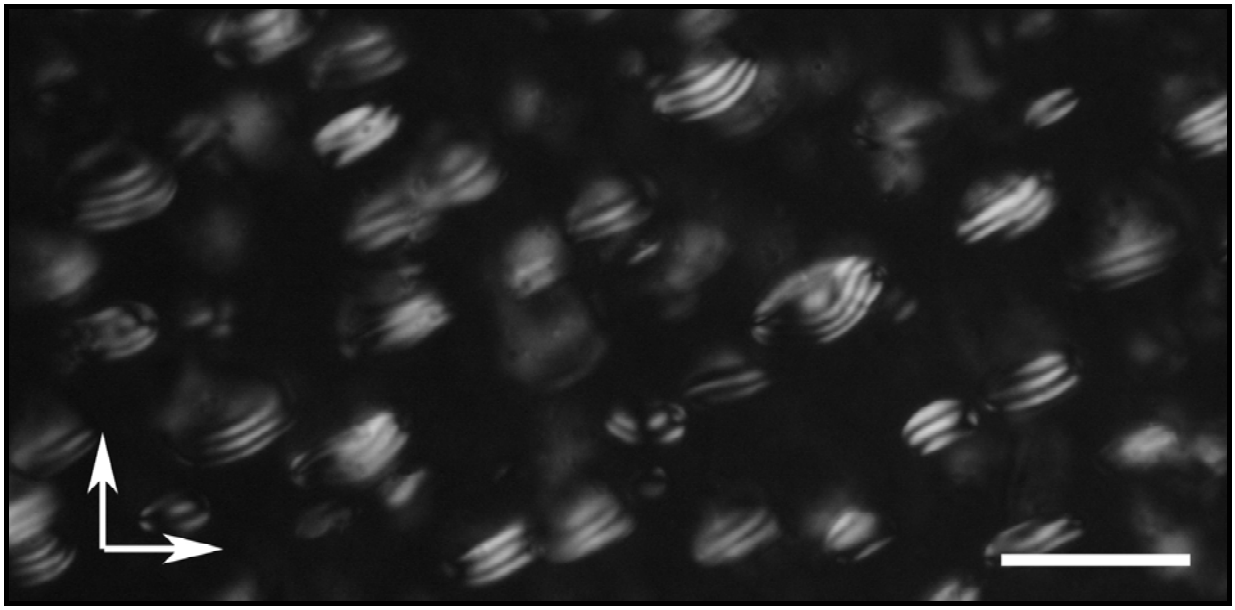


Figure 5 : Domaine biphasique observé en microscopie optique entre polariseurs croisés dans une microchambre. A une concentration critique inconnue, des tactoïdes cholestériques apparaissent au sein de la phase isotrope. Ici, la solution injectée dans la microchambre avait été soniquée. Barre d'échelle = 50 μm. Photo : G. Mosser.

En nous appuyant sur ces connaissances, nous avons voulu préciser le diagramme de phases du collagène en solution dans de l'acide acétique. L'objectif était de déterminer les concentrations critiques en fonction de la force ionique du milieu. En effet, le système de microchambre, dans lequel les phases sont présentes dans un gradient continu, rend difficile la mesure précise des concentrations. Nous avons donc entrepris de préparer une série d'échantillons de compositions connues. Compte tenu de durées importantes liées à la préparation des échantillons, nous avons dû nous limiter à trois séquences de phases. Cependant,

§ Un second critère est la discontinuité du paramètre d'ordre. Nous examinerons ce critère plus bas à l'aide de la diffusion des rayons X.

avant de présenter ces résultats spécifiques, nous rapportons ci-dessous quelques observations sur l'étude en microscopie optique à lumière polarisée de nos échantillons.

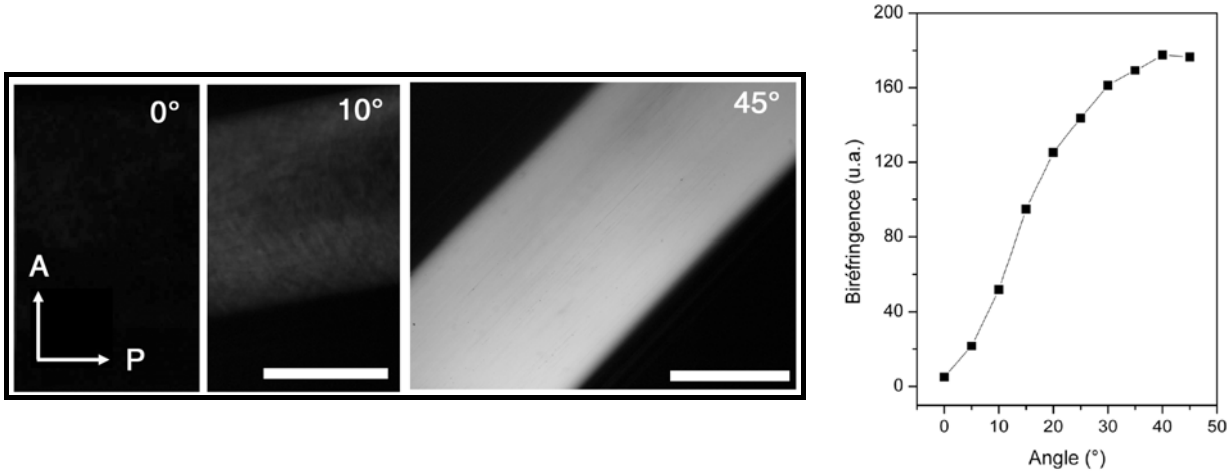


Figure 6 : Phase anisotrope (90 mg/ml) aspirée dans un capillaire plat de 200 µm d'épaisseur et observé en microscopie optique entre polariseurs croisés. La lumière est complètement éteinte quand le directeur du nématique est orienté suivant la direction de l'un ou l'autre des polariseurs (0° ou 90°). La biréfringence de l'échantillon devient visible entre ces deux orientations, avec un maximum de transmission à 45°. Barre d'échelle = 1 mm. Sur le graphe, évolution de l'intensité lumineuse (unité arbitraire) en fonction de l'axe du capillaire par rapport à l'un des polariseurs. L'intensité lumineuse reportée a été mesurée avec le logiciel ImageJ.

Textures en bandes – Les solutions nématiques modérément cisaillées peuvent relaxer au bout de plusieurs jours. Dans notre cas, le cisaillement est produit lors de l'aspiration de la solution dans les tubes capillaires, ce qui correspond à un taux de cisaillement de l'ordre de 10 s^{-1} (Figure 6). Les échantillons présentent alors des textures en bandes complexes (Figure 7), le plus souvent perpendiculaires à la direction du cisaillement et comparables à celles fréquemment rencontrées dans les polymères cristaux liquides cisaillés[45]. L'insertion d'une lame quart d'onde entre le polariseur et l'analyseur colore les bandes alternativement en bleu et en orange, ce qui indique que les molécules sont orientées obliquement dans chaque domaine et que leur orientation change d'une bande à la suivante. Ces bandes traduisent donc une ondulation périodique du directeur nématique autour de la direction du cisaillement[46]. Elles seraient dues au comportement élastique du polymère et attribuées à des « tensions de contraction » de l'échantillon déformé qui relaxe une fois la contrainte relâchée[47].

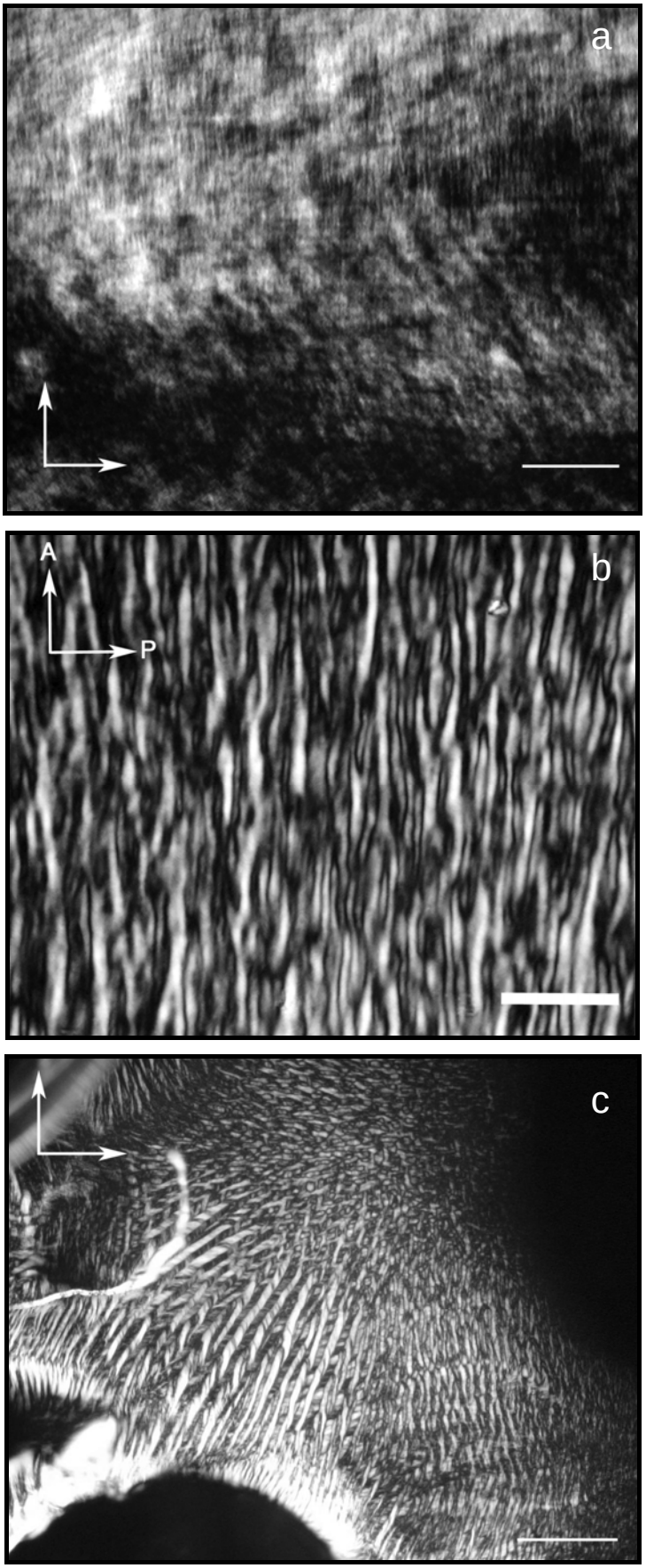
Des textures similaires ont déjà été observées dans des solutions de fragments d'ADN[48], de collagène[43,49,50] et de procollagène[51] lentement évaporées entre lames et lamelles, où elles ont été interprétées dans un premier temps comme un signe de la mise en place d'une phase cholestérique et, à ce titre, qualifiées d'états « précholestériques ». Cependant, d'autres facteurs tels que des forces de tensions de surface ou un gradient de concentration peuvent aussi

influencer la formation de textures en bandes lors de l'évaporation d'un solvant. De tels facteurs peuvent expliquer les textures observées sur la Figure 7c et à l'interface air/liquide dans les microchambres.

Ces textures ont aussi été décrites de façon plus complète avec du poly-γ-Benzyl-L-Glutamate (PBLG)[52], où l'influence du taux de cisaillement et du temps de relaxation après l'arrêt du cisaillement avait été étudiée. Enfin rappelons au passage que de telles textures périodiques ont été observées de manière transitoire en appliquant un champ magnétique orthogonal au directeur de polymères cristaux liquides nématiques[53,54].

Par ailleurs, M.-M. Giraud-Guille a souligné la similitude existant entre l'organisation des molécules dans ce type d'états mésomorphes et la structure ondulée observée dans les tendons[55,56], et a montré que l'ondulation périodique pouvait être conservée dans les gels fibrillaires de collagène[57]. Si la formation de ces bandes peut être contrôlée (concentration, taux de cisaillement), nous pouvons envisager d'intéressantes perspectives pour la synthèse de matériaux organisés, possédant éventuellement des propriétés mécaniques proches de celles du tendon. De tels tests mécaniques ont déjà été entrepris sur des films séchés de 2-hydroxypropyl cellulose dont la phase cristal-liquide a été préalablement texturée par cisaillement[58]. Les auteurs de cette étude ont d'une part relié la longueur d'onde des bandes au taux de cisaillement et montré que les films étaient cassants quand ils étaient soumis à un étirement dans la direction du cisaillement et ductiles dans la direction transverse.

Figure 7 (page ci-contre) : Exemples de textures observées en microscopie optique à lumière polarisée. Echantillons placés dans une cellule en quartz de 200 µm d'épaisseur. **(a)** 100 mg/ml, juste après Barre d'échelle = 200 µm ; **(b)** le même échantillon relaxé, au bout de quelques jours. Barre d'échelle = 100 µm. **(c)** solution isotrope mise en contact avec un flocon de polyéthylène glycol (PEG). Le PEG solubilisé a un effet de déplétion sur le solvant, ce qui conduit à concentrer localement le collagène. Barre d'échelle = 200 µm.


a
A
P
b
c

Séparation de phases – De manière générale, pour des échantillons biphasiques, dans le domaine de concentration où coexistent les phases isotrope et nématique, il est fréquent d'observer la formation de domaines d'une des phases, généralement anisotrope, au sein de l'autre. La phase anisotrope étant plus dense que la phase isotrope puisque la fraction volumique en soluté y est plus grande, elle sédimente le plus souvent pour former une phase continue, séparée du milieu isotrope par une interface franche. Dans le cas du collagène, nous n'avons jamais pu observer une telle séparation de phase macroscopique par sédimentation.

Lorsqu'un échantillon supposé biphasique est introduit par aspiration dans un capillaire, il présente dans un premier temps une biréfringence assez uniforme liée au cisaillement. Même si l'échantillon relaxe et que la biréfringence diminue d'intensité, nous n'avons pu observer ni la formation de sphérulites, ni de séparation de phase macroscopique isotrope/nématique, même après plusieurs mois. De même, pour des échantillons clairement nématiques, les textures en empreintes digitales ne réapparaissent pas, même après des temps très longs. La gélification (physique) semble être la principale responsable de ce blocage. Il faut rappeler ici que nos solutions n'ayant pas été soniquées, elles sont probablement plus viscoélastiques que les solutions étudiées précédemment. Le même phénomène a été constaté avec des solutions d'actine : la coexistence de phases n'est observable que pour des brins de taille réduite. Cependant, contrairement aux auteurs de cette étude nous n'en concluons pas un changement du mécanisme de la transition, mais plutôt à un blocage cinétique. Pour autant, cette plus forte viscoélasticité n'empêche pas nos solutions de former une phase cholestérique dans les conditions expérimentales adéquates (par exemple dans les microchambres, Figure 4) et, comme nous le verrons au chapitre 4, nous retrouvons dans certains gels stabilisés observés en microscopie électronique des structures hélicoïdales. Le pas de l'hélice communément observé est de l'ordre de quelques microns. Par contre, nous n'observons pas, dans ce cas, la formation de sphérulites.

Comme nous le verrons plus loin (dans le Chapitre 3), les propriétés rhéologiques évoluent rapidement au voisinage de la transition isotrope/cholestérique. Aussi, l'organisation d'une phase cholestérique ne se fait probablement que lorsque le collagène se concentre lentement sans subir de perturbations mécaniques extérieures.

Influence du solvant sur la transition : construction des séquences de phases – Trois solutions à 5 mg/ml de collagène ont été préparées dans respectivement 5, 50 et 500 mM d'acide acétique. Nous avons ensuite progressivement fait évaporer le solvant sous une hotte à flux laminaire stérile afin de concentrer lentement le collagène. Régulièrement, nous avons prélevé, dosé et testé la biréfringence d'échantillons de ces trois solutions.

Nous avons choisi la méthode de concentration par évaporation de solvant parce que, bien que consommatrice de temps, cette méthode est relativement pratique pour préparer une grande série d'échantillons. Cependant, elle présente l'inconvénient majeur, par rapport à la concentration par dialyse[**], de modifier la composition du solvant car l'eau s'évapore plus vite que l'acide acétique. Or, il est indispensable de connaître la composition du milieu pour les calculs théoriques. Pour tenter de prendre en compte de cet effet, nous avons évaporé des solutions d'acide acétique dans les mêmes conditions que les solutions de collagène et réalisé un titrage acido-basique. La faible quantité d'échantillon disponible et surtout leur viscosité ne permettent pas de titrer directement les solutions de collagène pour en tirer la concentration en acide acétique. Il faut aussi noter qu'à de fortes concentrations il se peut que le collagène, qui possède des propriétés de polyampholyte, modifie légèrement le pH. Par ailleurs, nous avons préparé quelques échantillons par dialyse, et les points, quoique peu nombreux, prennent place de façon cohérente sur le diagramme construit (Cf. Figure 9).

Pour tester la biréfringence des échantillons, nous les avons aspirés dans des capillaires plats de 200 μm d'épaisseur intérieure afin d'en observer entre polariseurs croisés les éventuelles textures. Les solutions diluées sont isotropes et apparaissent noires entre polariseurs croisés. Le fait d'aspirer les échantillons cisaille les solutions et a pour effet d'induire une faible biréfringence d'écoulement. Celle-ci disparaît en quelques secondes, voire minutes dans le cas de solutions isotropes proches de la transition. Dans le cas de solutions anisotropes (cholestériques), le cisaillement a pour effet de dérouler la structure cholestérique et d'aligner les domaines nématiques (Figure 6). Nous avons choisi de placer la limite inférieure (diluée) du domaine de coexistence, c'est-à-dire C_i, concentration de la phase isotrope à la transition, quand les solutions restent biréfringentes au repos.

Lors de l'évaporation du solvant pour concentrer le collagène, nous avons vu que l'acide acétique se concentrait lui aussi. Par ailleurs, le taux de dissociation de ce dernier contrôle le pH, et influe sur la force ionique du milieu. Il nous a donc fallu tenir compte de la variation de ces deux paramètres. Quand le taux d'acide acétique dissocié augmente, le pH diminue et la force

[**] Voir Chapitre 1, §1.2.3 pour la présentation comparée des différentes méthodes de concentration du collagène.

ionique augmente. Le pH a alors pour effet d'augmenter la charge nette portée par le collagène, tandis que la force ionique écrante les charges. Sur la Figure 8, nous avons reporté la variation de charge nette du collagène en fonction du pH. Nous voyons que la charge nette décroît de seulement 10% sur toute la zone étudiée. Dans le même intervalle de pH (2 à 4) la force ionique liée à la dissociation de l'acide acétique se déploie sur deux décades (de 10^{-2} à 10^{-4}). Dans la section suivante (§ 2.3), nous quantifierons les effets de la force ionique en calculant la longueur de Debye dans le milieu et le diamètre effectif des molécules.

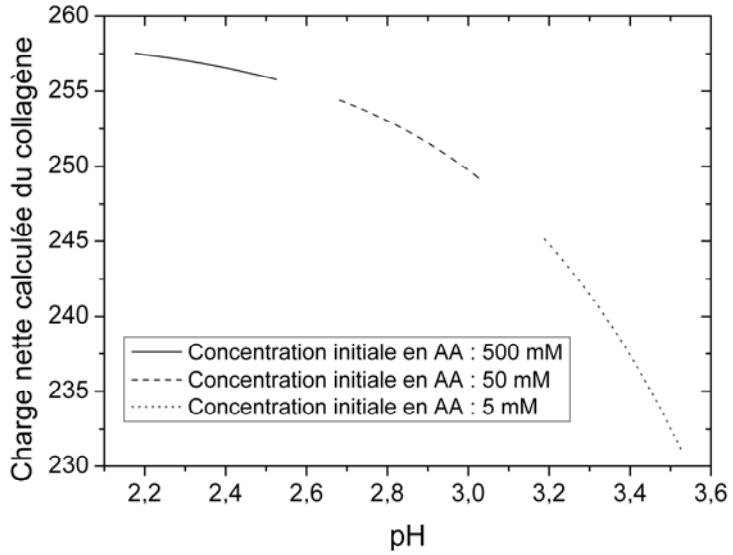


Figure 8 : Charge nette du collagène en fonction du pH pour les trois séquences de phase de la Figure 9. En concentrant le collagène par évaporation du solvant, l'acide acétique se concentre aussi, ce qui impose une baisse du pH qui a pour effet de modifier la charge nette portée par le collagène.

Le bilan de nos observations est reporté dans la Figure 9. Les concentrations critiques augmentent de 50-60 mg/ml à 80-85 mg/ml quand la concentration initiale en acide acétique augmente de 5 à 500 mM. De plus, à la manipulation, les solutions semblent plus visqueuses pour des forces ioniques plus faibles. Qualitativement, si nous considérons que la force ionique croissante a pour effet d'écranter les charges portées par les molécules, le diamètre effectif de ces dernières doit diminuer ; ceci a pour effet réduire les effets de volume exclu, et donc de stabiliser la phase isotrope. La transition a donc lieu à des concentrations plus élevées. Nous calculerons plus loin les valeurs du diamètre effectif des particules dans ces différentes conditions afin de vérifier cette hypothèse.

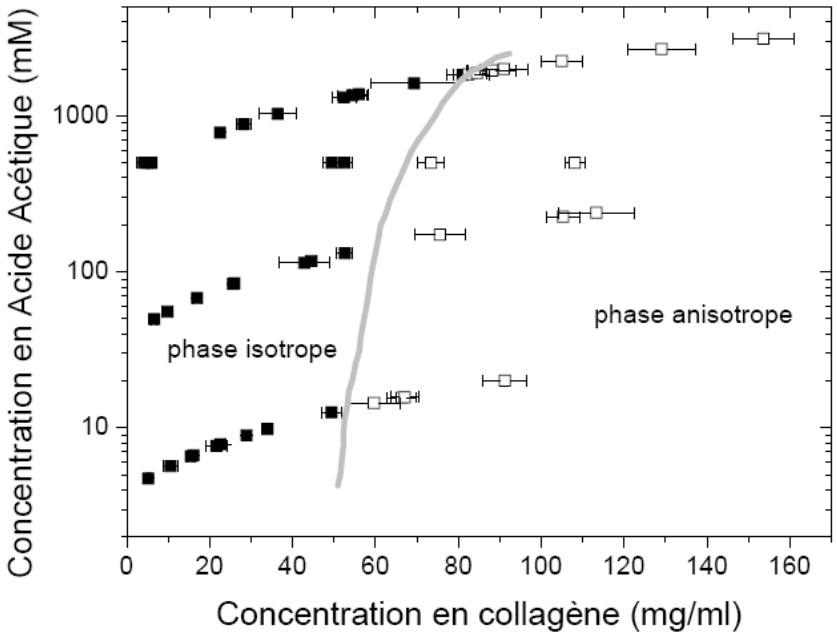


Figure 9 : Trois séquences de phases. Des solutions de collagène de concentration croissante ont été préparées dans trois concentrations différentes en acide acétique. Les échantillons isotropes apparaissent noirs entre polariseurs croisés (■). Au-dessus d'une concentration critique une phase anisotrope apparaît : les échantillons sont fortement biréfringents entre polariseurs croisés (□). La ligne grise indique schématiquement la région de la transition isotrope/nématique. Les concentrations en acide acétique reportées en ordonnées ont été extrapolées à partir du dosage pH-métrique de solutions d'acide acétique seul. Cependant, cette correction ne modifie pas la tendance globale observée. Les points sur l'horizontale C_{AA} = 500 mM correspondent aux échantillons concentrés par dialyse.

2.2.2 Diffusion des rayons X aux petits angles

Cette technique nous a permis d'examiner un peu plus en détail la structure interne des solutions de collagène de concentrations allant de 20 à 160 mg/ml, de part et d'autre de la transition repérée précédemment par des méthodes optiques.

Le collagène étant un faible diffuseur, et présentant peu de contraste électronique par rapport à l'eau, cette étude a nécessité l'utilisation d'un rayonnement synchrotron très brillant. Nous avons pour cela collaboré avec Pierre Panine sur la ligne ID02 de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble. Les caractéristiques de cette ligne sont décrites dans le Chapitre 1 (§ 1.3.2). Des clichés de diffusion de solutions évaporées entre lame et lamelle, présentés dans le mémoire de thèse de R. Martin, avaient déjà été obtenus sur la ligne D43 du LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique, à Orsay (1974-2005)) ; malheureusement la concentration précise de ces échantillons était inconnue. Nous avons donc entrepris de reprendre cette étude en préparant des échantillons de concentration connue. De plus, de la

même façon que nous avons aligné nos échantillons par cisaillement dans la section précédente, nous avons utilisé ici une cellule de cisaillement en polycarbonate de géométrie cylindrique[59,††] (Cellule de Couette, Figure 10) pour renforcer le signal en alignant les différents domaines nématiques dans une même direction. Cette méthode est communément utilisée pour l'étude des cristaux-liquides[60,61]. Elle peut parfois être avantageusement remplacée par l'imposition d'un champ magnétique[2,18,62]. Cependant, dans le cas du collagène, comme pour l'ADN[63] ou les nanoparticules de chitine, l'orientation des molécules de collagène dans un champ magnétique est perpendiculaire au champ appliqué[64], ce qui rend cette méthode inemployable dans ce contexte car elle ne permet pas de former des monodomaines nématiques.

Un autre avantage à l'utilisation d'une cellule de Couette est que le volume d'échantillon soumis au rayonnement est sans cesse renouvelé au cours de l'acquisition, ce qui limite les éventuels dégâts d'irradiation.

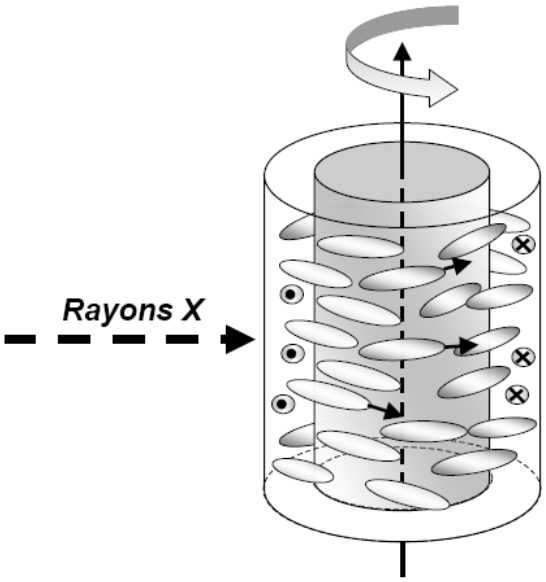


Figure 10 : Schéma d'une cellule de cisaillement cylindrique en géométrie radiale. Dans notre cas, le stator (creux) est la partie grisée. Les ellipses représentent les molécules de collagène orientées par le cisaillement. Les éléments de la cellule sont en polycarbonate transparent aux rayons X ; leurs parois mesurent 100 µm d'épaisseur. L'entrefer mesure 1 mm, donc l'épaisseur d'échantillon traversée par les rayons X est de 2 mm. L'expérience nécessite environ 2 ml d'échantillon.

†† Nous présenterons dans le chapitre suivant les données purement rhéologiques mesurées à cette occasion. Se reporter à ce même chapitre pour un rappel des définitions et du formalisme propres à la rhéologie.

Solutions isotropes concentrées – La faiblesse du signal de diffusion pour les solutions très diluées ($C < C^* = 0{,}0185$ mg/ml) ne nous a pas permis d'étudier le facteur de forme de collagène[#]. Il serait cependant envisageable de tenter une telle étude en diffusion de neutrons. Ceci nécessiterait de mettre le collagène en solution dans un mélange d'eau et d'acide acétique deutéré afin d'obtenir le contraste optimal.

En revanche, dès 20 mg/ml, nous avons pu détecter un facteur de structure sous la forme d'un pic de corrélation intermoléculaire. Ce pic de corrélation est dû à l'apparition d'un ordre positionnel local des molécules dans la solution et il est alors possible de remonter à une distance moyenne entre elles. Au repos, le signal de diffusion des rayons X se présente sous la forme d'un halo diffus (Figure 11a), signature d'une solution isotrope, comme les observations en lumière polarisée nous le laissaient deviner. Sur les regroupements angulaires $I = f(q)$, donnant l'intensité diffusée en fonction du module du vecteur de diffusion q (en nm^{-1}, dans l'espace réciproque), nous n'observons en fait de pic de corrélation qu'un faible épaulement (Figure 12). En revanche, sous fort cisaillement ($\dot{\gamma} \geq 300$ s^{-1}), il est possible d'aligner l'échantillon transitoirement – l'échantillon relaxe dès que le cisaillement cesse, conformément aux observations en microscopie optique (voir plus haut) –, ce qui a pour effet de concentrer tout le signal dans une seule direction et de faire ressortir un pic de corrélation du fond continu (Figure 12 et Figure 15). De fait, ce maximum est clairement visible sur les clichés (Figure 11). Pour une solution à 20 mg/ml, le maximum est situé à un vecteur $q_{max} \sim 0{,}4$ nm^{-1}, inversement proportionnel à la distance moyenne entre les triple hélices $d_{moy} \sim 14$ nm. On se convaincra avec la Figure 12 que le cisaillement ne modifie pas la position du signal de corrélation et donc l'interdistance moléculaire moyenne dans la solution. Il ne s'agit donc pas ici d'une transition de phase sous cisaillement comme celle observée avec les solutions de micelles géantes[65,66].

[#] La diffusion des rayons X aux très petits angles permet de mesurer le facteur de forme des particules diffusantes sous la forme d'une décroissance du signal. La modélisation de cette décroissance permet de remonter à leurs dimensions géométriques sous la forme d'une grandeur appelée rayon de giration. Pour plus de détails, consulter Guinier A. "X-ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies" (1994, Dover Publications).

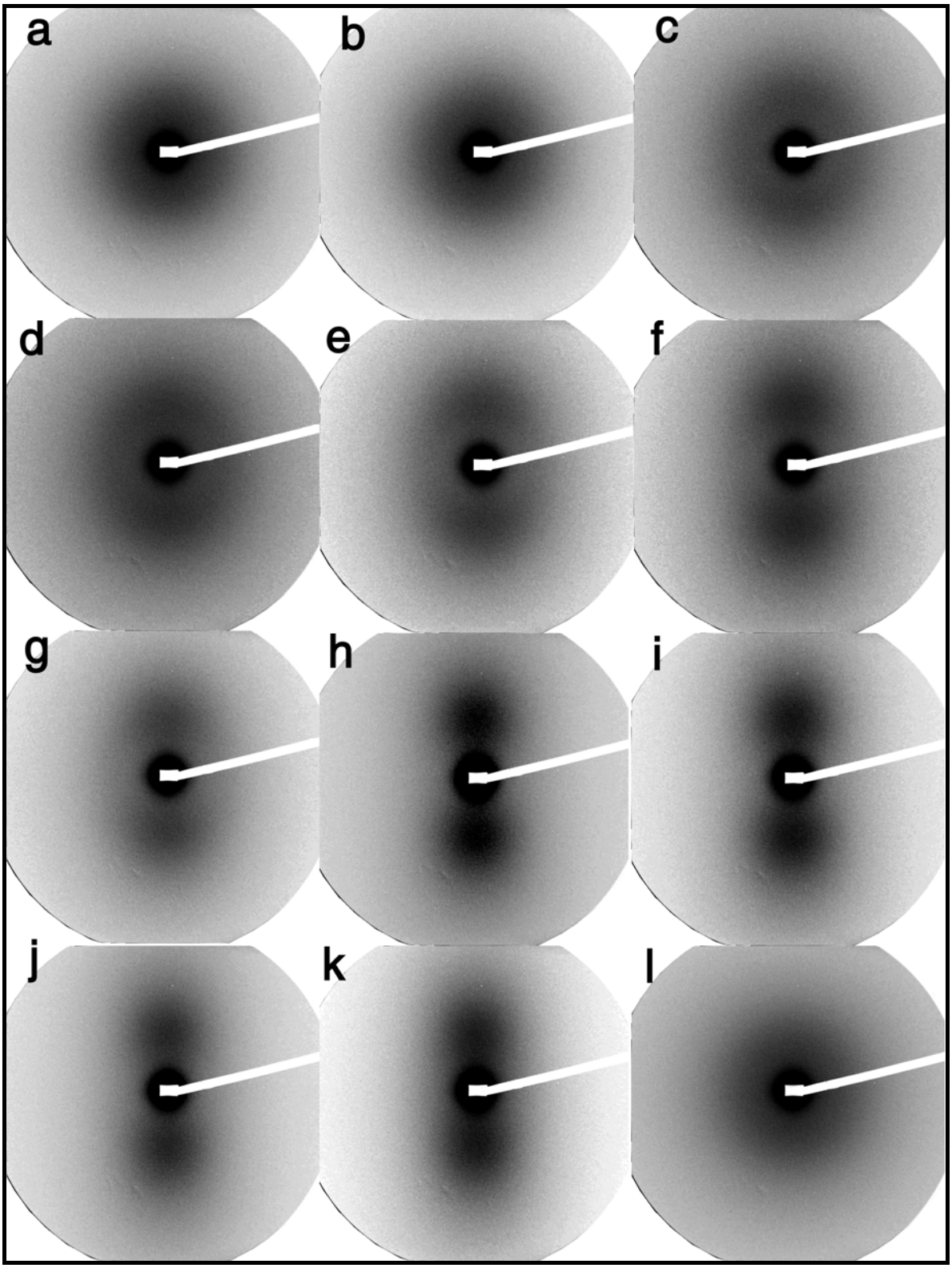


Figure 11 : Clichés de diffusion des rayons X d'un échantillon isotrope (37 mg/ml); a) Au repos ($\dot{\gamma}$ = 0 s^{-1}) ; b) $\dot{\gamma}$ = 1 s^{-1} ; c) $\dot{\gamma}$ = 2 s^{-1} ; d) $\dot{\gamma}$ = 4 s^{-1} ; e) $\dot{\gamma}$ = 16 s^{-1} ; f) $\dot{\gamma}$ = 64 s^{-1} ; g) $\dot{\gamma}$ = 100 s^{-1} ; h) $\dot{\gamma}$ = 200 s^{-1} ; i) $\dot{\gamma}$ = 300 s^{-1} ; j) $\dot{\gamma}$ = 400 s^{-1} ; k) $\dot{\gamma}$ = 600 s^{-1} ; l) juste après l'arrêt du rotor.

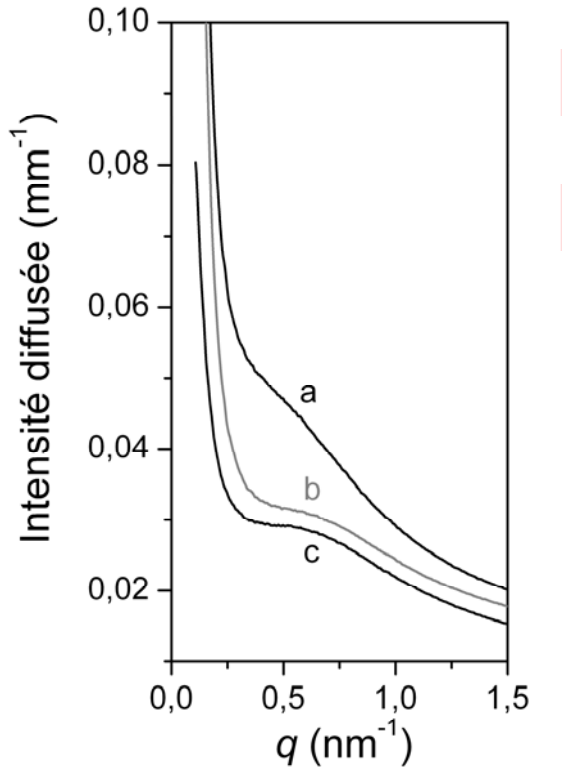


Figure 12 : Regroupement angulaire (180°) de l'intensité diffusée par une solution de collagène isotrope (37 mg/ml) au repos (a) et sous cisaillement (b et c, $\dot{\gamma}$ = 300 s^{-1}). Au repos, seul un épaulement est détectable ; sous cisaillement un faible pic apparaît. Ce dernier ne devient clairement visible que sur les profils linéaires pris à travers la tache diffuse (c et Figure 15).

Solutions anisotropes – La diffusion des rayons X par des solutions concentrées au-delà de la transition isotrope/cholestérique fournit des clichés fortement anisotropes après cisaillement. Ici, le cisaillement est très modéré ($\dot{\gamma}$ = 4-8 s^{-1}) et ne sert qu'à « dérouler » la phase cholestérique en surmontant la contrainte de torsion. Il permet ainsi d'aligner la phase sous la forme d'un monodomaine nématique, afin de renforcer l'intensité diffusée[§§]. L'alignement est conservé lorsque le cisaillement cesse, ce qui est cohérent avec les observations optiques de biréfringence des solutions alignées dans un capillaire. L'anisotropie de l'intensité diffusée suit la direction verticale, ce qui indique que les molécules de collagène sont orientées horizontalement, le long de la direction de l'écoulement. Pour une solution à 91 mg/ml, le pic de corrélation est déplacé vers les grandes valeurs de q, par rapport à l'exemple précédent à 20 mg/ml. On trouve cette fois une valeur de q_{max} ~ 1,12 nm^{-1}, soit une interdistance moyenne de ~6,45 nm. D'un point de vue expérimental, il est intéressant de noter que nous avons également obtenu un cliché similaire à

[§§] Nous présentons en annexe 2 les profils linéaires et azimutaux en fonction du taux de cisaillement démontrant que ce dernier ne modifie ni la position q_{max} du maximum du pic de corrélation ni la valeur du paramètre d'ordre.

celui produit par cisaillement dans la cellule de Couette en aspirant simplement la solution dans un capillaire (Figure 14). À partir de 166 mg/ml, le pic de corrélation s'élargit et devient plus difficilement détectable, ce qui suggère que les répulsions électrostatiques qui prédominaient à des concentrations plus basses deviendraient comparables aux interactions attractives. Cette observation peut sembler contre-intuitive, puisqu'on pourrait s'attendre à ce que les interactions entre proches voisins soient renforcées lorsque les molécules se rapprochent, c'est-à-dire quand la concentration augmente. Cependant, une telle disparition du pic de corrélation dans des suspensions de particules allongées stabilisées par des répulsions électrostatiques est plutôt la règle que l'exception[11,12,67]. Cette vraisemblable entrée dans un domaine partiellement attractif se traduit par une viscoélasticité élevée des solutions, qui rend impossible d'insérer des solutions plus concentrées dans la cellule de cisaillement. Ce phénomène sera plus longuement discuté dans les Chapitres 3 (gélification) et 4 (formation d'agrégats en solutions acides, § 4.3.3).

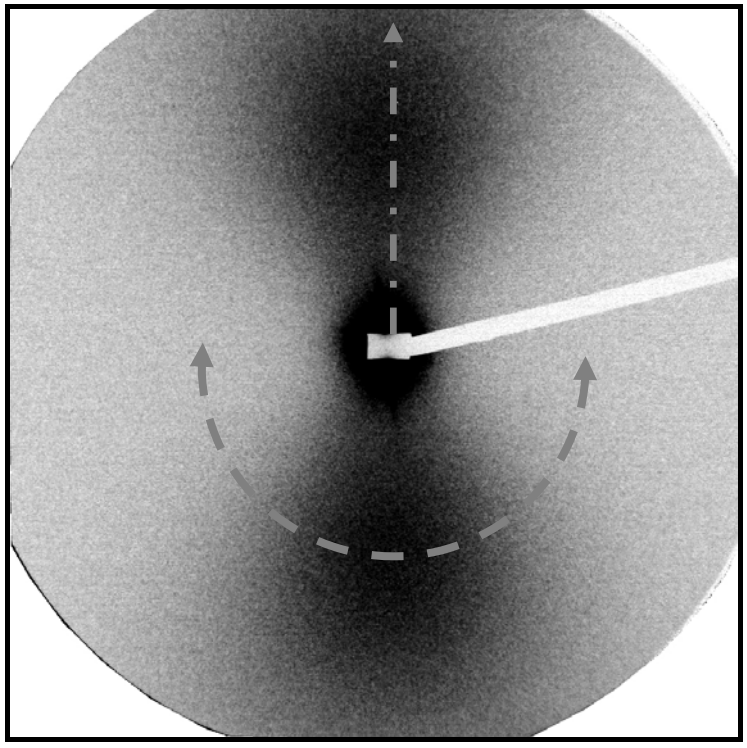


Figure 13 : Cliché de diffusion des rayons X aux petits angles d'une solution de collagène anisotrope (91 mg/ml) dans une cellule de cisaillement. Un cisaillement modéré ($\dot{\gamma} = 8\ s^{-1}$) a été appliqué pour dérouler la texture hélicoïdale du cholestérique et produire un monodomaine par alignement uniaxial.

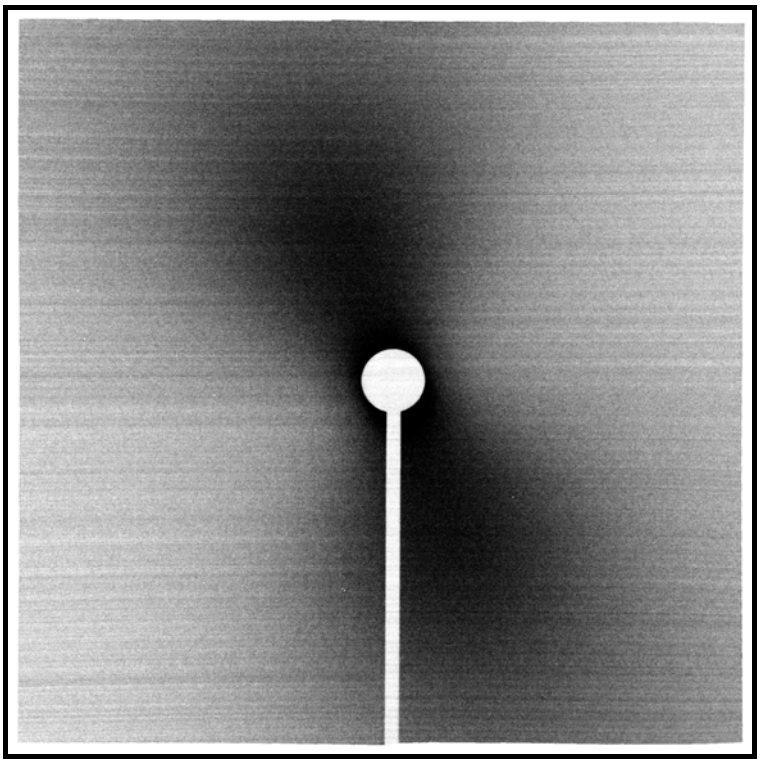


Figure 14 : Cliché de diffusion des rayons X aux petits angles d'une solution de collagène anisotrope (84 mg/ml) aspiré dans un capillaire.

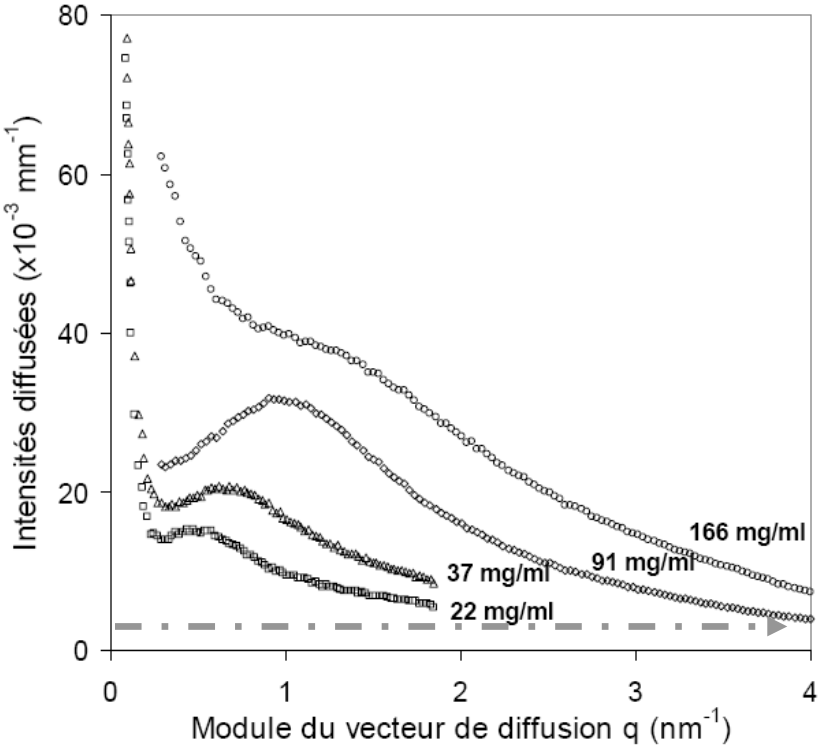


Figure 15 : Profils linéaires de l'intensité diffusée *I* en fonction du module du vecteur de diffusion *q* (nm^{-1}), pris le long de l'orientation des clichés de diffusion de solutions de part et d'autre de la transition de phase. Le profil de la solution à 91 mg/ml est matérialisé sur la Figure 13.

Mesure du paramètre d'ordre – La mesure de la variation d'intensité le long d'une coupe azimutale (arc en pointillé sur la Figure 13) nous permet d'estimer la valeur du paramètre d'ordre de la phase nématique. En effet, dans la phase anisotrope, les molécules de collagène sont alignées le long d'une direction moyenne *n* (directeur du nématique) suivant une fonction de distribution orientationnelle f(**a**), où **a** est le vecteur unité associé à chaque molécule. Le premier moment non nul de la fonction de distribution, qui quantifie la qualité de l'orientation, est appelé paramètre d'ordre nématique (*S*). Le profil de l'intensité diffusée prise à un module *q* fixé en fonction de l'angle azimutal ψ peut ainsi être modélisé suivant une procédure décrite par P. Davidson *et al*[68]. Un profil plat correspond à un échantillon complètement désordonné ($S = 0$) et à l'inverse, un pic très aigu indique un fort alignement des molécules ($S \rightarrow 1$). Pour un échantillon nématique typique (par exemple 91 mg/ml dans 500 mM d'acide acétique), biréfringent au repos, le paramètre d'ordre *S* calculé est de $0{,}45 \pm 0{,}1$ (Figure 16). Pour les solutions isotropes (Figure 17), on trouve bien, au repos, un paramètre d'ordre *S* nul. Sous l'effet d'un cisaillement de l'ordre de 1 s^{-1} seulement, les solutions s'alignent brutalement jusqu'à $S = 0{,}1$. Lorsque le taux de cisaillement est encore augmenté, S continue de croître, mais la courbe s'infléchit. Théoriquement, sa valeur doit tendre vers 1, mais l'expérience montre que cette progression est très lente en fonction de $\dot{\gamma}$. De plus, l'utilisation du cisaillement est limitée pour les solutions les plus concentrées car des instabilités mécaniques se développent pour des taux de cisaillement élevés.

Notons au passage que le paramètre d'ordre nématique peut aussi être mesuré à l'aide du facteur de forme obtenu par diffusion des rayons X aux grands angles ainsi que via la biréfringence optique des échantillons[69]. Cette dernière procédure nécessite cependant de connaître la biréfringence à saturation du collagène (c'est-à-dire quand les molécules sont parfaitement alignées).

Dans le cas présent, la viscoélasticité des solutions concentrées est telle que l'application d'un champ de plusieurs Teslas n'a pas permis de modifier l'orientation des molécules de façon significative. De plus, il est connu que les molécules de collagène, à l'état dispersé, s'alignent perpendiculairement au champ, ce qui ne permettrait donc pas de former un monodomaine nématique, à moins de disposer d'un champ tournant. Dans ce cas, l'axe du collagène s'alignera parallèlement à l'axe de rotation du champ magnétique. Les observations reportées dans la Figure 6 ne nous ont donc pas permis d'effectuer cette mesure.

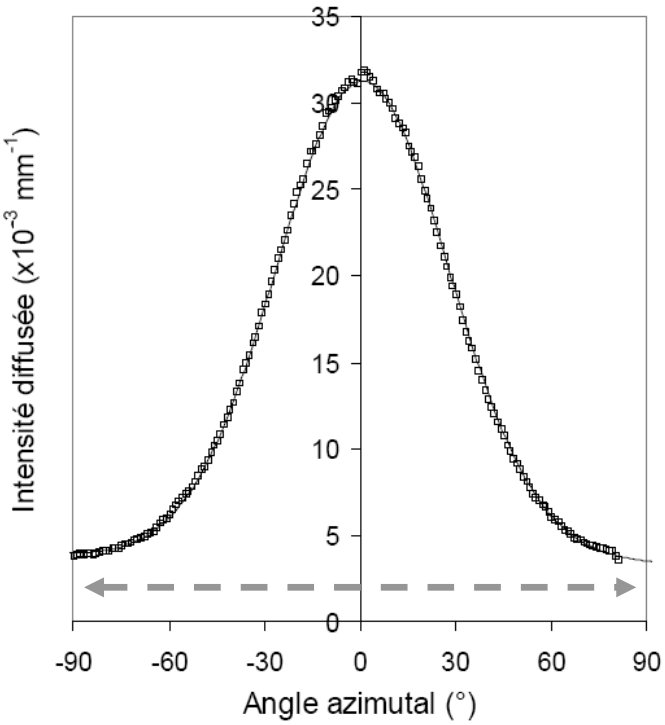


Figure 16 : profil azimutal experimental (□) modélisé à l'aide d'une fonction de Maier-Saupe (ligne continue). Le profil correspond à l'intensité diffuse mesurée le long d'un arc de 180° passant par q_{max}. (arc matérialisé sur le cliché Figure 13). Le paramètre d'ordre correspondant est de l'ordre de 0,45.

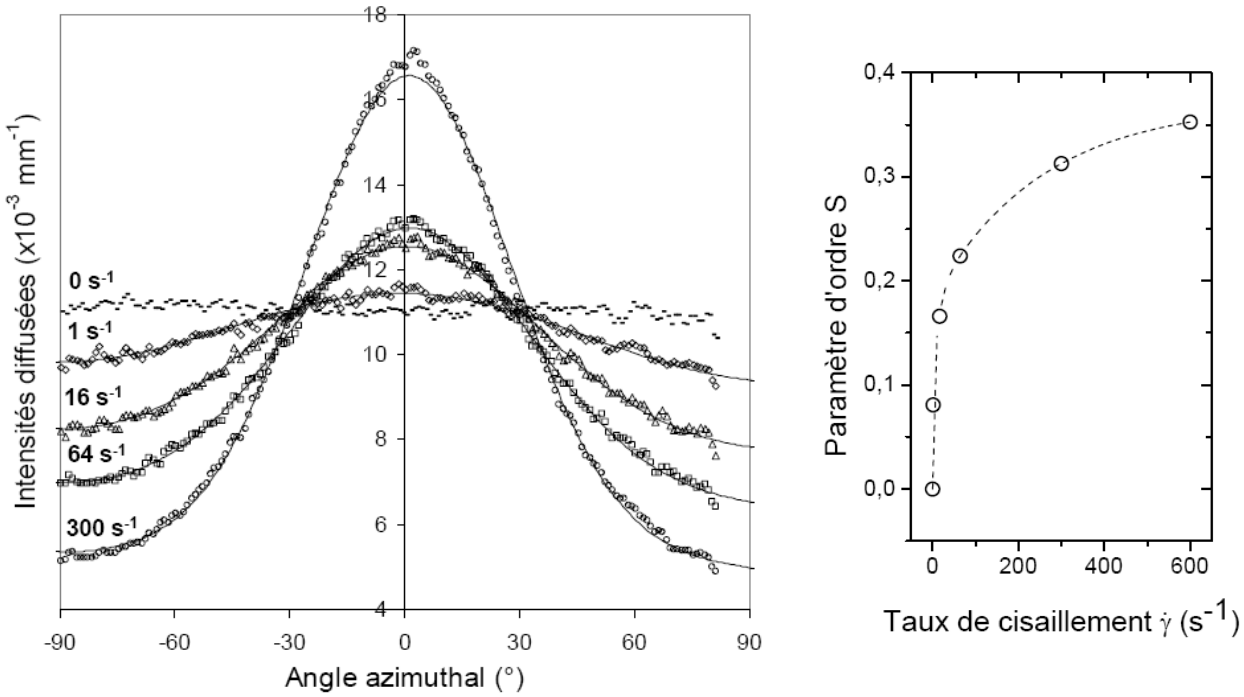


Figure 17 : À gauche : profils azimutaux d'une solution isotrope (37 mg/mL) soumis à un cisaillement de plus en plus intense ($\dot{\gamma}$ = 0, 1, 16, 64 et 300 s^{-1}). Le profil est plat au repos et devient rapidement plus aigu. À droite : valeurs du paramètre d'ordre *S* estimé en modélisant les profils azimutaux expérimentaux en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$.

Loi de dilution – Sur la Figure 15, on voit facilement que la position dans l'espace réciproque du maximum d'intensité diffusée, q_{max}, augmente avec la concentration. Puisque la distance moyenne entre les molécules d_{moy} est inversement proportionnelle à q_{max} ($d_{moy} \propto 1/q_{max}$), cela signifie que les molécules se rapprochent les unes des autres lorsque leur fraction volumique Φ augmente.

Pour calculer la distance moyenne entre les molécules d_{moy}, nous avons fait que l'hypothèse que les axes des molécules (modélisées par des bâtonnets de longueur L et de diamètre R, avec $L>>R$) sont placés localement sur un réseau hexagonal bidimensionnel (ordre à courte portée) (voir Figure 18). On a alors :

$$d_{hkl} = \frac{2\pi}{q} = \frac{\sqrt{3}}{2}a = \frac{\sqrt{3}}{2}d_{moy} \qquad \textbf{(6)}$$

où d_{hkl} est la distance moyenne entre deux plans denses qui diffusent et $a = d_{moy}$ le côté de la maille hexagonale (ou encore l'interdistance moléculaire). Les valeurs des distances intermoléculaires moyennes d_{moy} ainsi déterminées sur les clichés de diffusion des échantillons isotropes et nématiques ont été reportées sur la Figure 19 en fonction de l'inverse de la racine carrée de la fraction volumique ($\Phi^{-1/2}$). On remarque que tous les points expérimentaux, qu'ils soient obtenus avec des échantillons isotropes ou nématiques se répartissent suivant une droite. Ce comportement est attendu pour des solutions (isotropes et nématiques) dont la concentration est bien supérieure à la concentration de recouvrement $C^* = 1/L^3$ (soit 0,0185 mg/ml pour le collagène)[12,63,69-74].

Par ailleurs, comme $L >> D$ on peut approximer la fraction volumique par le rapport de la surface occupée par les molécules et de la surface de la maille :

$$\Phi = \frac{S_{collagène}}{S_{maille}} \qquad \textbf{(7)}$$

avec :

$$S_{maille} = a^2 \cos 30° = a^2 \frac{\sqrt{3}}{2} \qquad \textbf{(8)}$$

$$S_{collagène} = \pi R^2 \qquad \textbf{(9)}$$

d'où :

$$R = a\sqrt{\frac{\Phi\sqrt{3}/2}{\pi}} \qquad \textbf{(10)}$$

Soit :

$$d_{hkl} = \sqrt{\frac{\sqrt{3}\pi}{8}}.\frac{D}{\sqrt{\Phi}} \qquad \textbf{(11)}$$

Inversement, dans notre graphe on trace :

$$d_{moy} = a = \sqrt{\frac{\pi}{2\sqrt{3}}}.\frac{D}{\sqrt{\Phi}} \qquad \textbf{(12)}$$

La pente du graphe (Figure 19)[***] (k = 0,952 D) nous donne un diamètre moyen $\overline{D}$ de 1,65 nm, comparable avec la valeur moyenne de 1,5 nm communément donnée dans la littérature. Évidemment, ceci ne signifie en aucun cas que la phase étudiée est hexagonale : elle n'en présente ni la signature en diffusion des rayons X, ni les textures caractéristiques en microscopie optique à lumière polarisée.

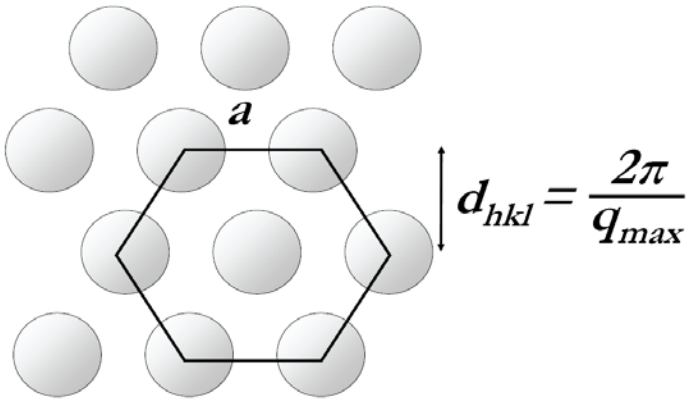


Figure 18 : Géométrie hexagonale bidimensionnelle

La largeur à mi-hauteur Δq des pics de corrélation est inversement proportionnelle à la longueur de corrélation $\xi = 2\pi/\Delta q$ de l'ordre liquide. Cet ordre positionnel est très local puisque ξ ne dépasse pas 25 nm à 20 mg/ml (où d_{moy} = 14 nm) et diminue quand la concentration augmente. À 91 mg/ml ξ ne vaut plus que 8,5 nm alors que d_{moy} = 6,45 nm. Dans le même intervalle de concentration le rapport ξ/d_{moy} diminue de 1,79 à 1,32. L'ordre positionnel se limite donc aux premiers voisins dans la solution, quelle que soit la concentration.

[***] La pente du graphe $d_{hkl} = 1/\sqrt{\Phi}$ (équation 11) est, elle, de 0,825.

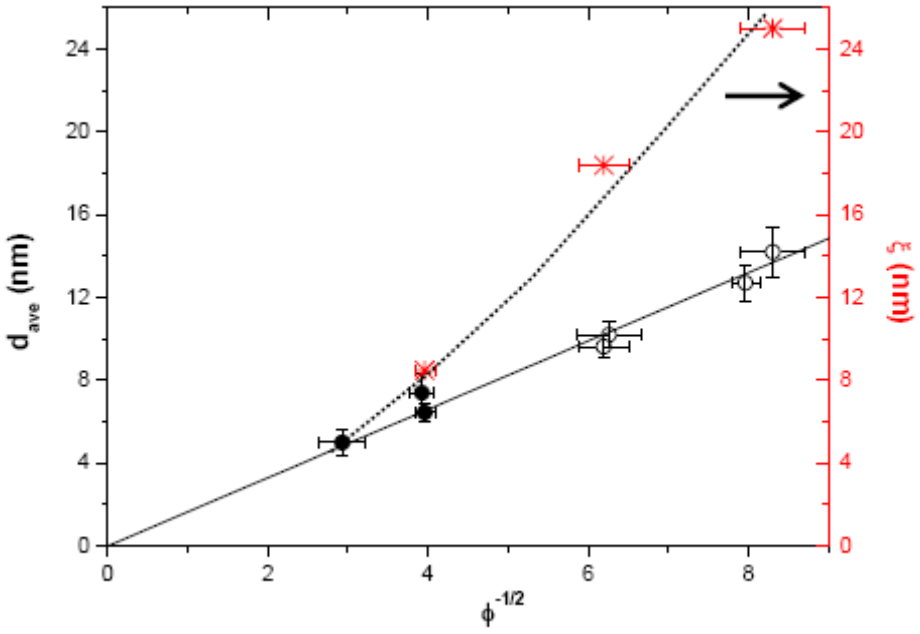


Figure 19 : Loi de dilution du collagène dans l'acide acétique 500 mM. La distance moyenne entre les triples hélices varie linéairement avec $\Phi^{-1/2}$, ce qui indique que les molécules se concentrent sur un réseau hexagonal bidimensionnel. La longueur de corrélation ξ de l'ordre local décroît lorsque la fraction volumique augmente.

2.3 Comparaison aux modèles théoriques

Dans cette section, nous allons utiliser différents modèles théoriques prévoyant les concentrations et le paramètre d'ordre à la transition isotrope/nématique et les comparer à nos résultats expérimentaux. Nous nous placerons d'emblée dans un régime électrostatique et nous montrerons qu'il est nécessaire de tenir compte de la semi-flexibilité des molécules.

2.3.1 Théorie de volume exclu (Onsager-Lee) en régime électrostatique

Formalisme – Le modèle proposé par Stroobants, basé sur l'article classique d'Onsager, considère une solution de N polyélectrolytes ayant la forme de bâtonnets de longueur L et de diamètre D, qui interagissent par les répulsions électrostatiques et de cœur dur (volume exclu). Après avoir écrit l'énergie libre dans la phase isotrope et dans la phase anisotrope, la fonction de distribution de l'orientation $f(\Omega)$ est déterminée en minimisant l'énergie libre par rapport aux variations de cette distribution. Les concentrations à la coexistence sont déterminées en

appliquant les conditions de coexistence, à savoir l'égalité des pressions osmotiques et du potentiel chimique dans les deux phases coexistantes.

Pour tenir compte des contributions électrostatiques, nous utiliserons la procédure proposée par Stroobants, consistant à calculer un diamètre effectif D_{eff} dans le cadre de la théorie d'Onsager. Le problème des interactions électrostatiques entre bâtonnets chargés a depuis été reconsidéré de façon plus complète par Chapot *et coll.*[75,76], mais sans aboutir à des expressions analytiques à notre portée. Nous nous contenterons donc d'appliquer une méthode plus simple, tout en étant conscients de ses limites.

Si nous suivons la procédure proposée par Stroobants, nous devons alors remplacer le diamètre géométrique D (1,5 nm) par le diamètre effectif $D_{\text{eff}} = D(1+\delta)$ où :

$$\delta = \frac{\ln A' + \gamma + \ln 2 + \frac{1}{2}}{\varkappa D} \qquad \textbf{(13)}$$

où nous introduisons la constante d'Euler γ (= 0,577215), la longueur de Debye $\varkappa^{-1}$ et A' un paramètre variable qui dépend de la charge linéique des bâtonnets. Dans une solution de polyélectrolytes, la longueur de Debye, $\varkappa^{-1}$, qui correspond à la distance au-delà de laquelle les charges sont écrantées, est définie par[77] :

$$\varkappa^2 = 8\pi Q(2n_s + \Gamma z_p c') \qquad \textbf{(14)}$$

où Q est la longueur de Bjerrum†††, n_s est la densité d'ions mobiles en solution (acide acétique dissocié), c' la densité de collagène, z_p le nombre de charges portées par le collagène et Γ le coefficient d'exclusion de Donnan, que nous prendrons égal à 1.

Il nous faut maintenant considérer la charge portée par les molécules de collagène. Dans la suite, une difficulté provient de l'évaluation du pH dans nos solutions. En effet, la charge du collagène dépend du pH. Or, du fait de notre choix de concentrer par évaporation, nous avons vu plus haut que la concentration en acide acétique augmente et fait varier le pH. Certes, la variation de pH reste faible, mais nous devons en tenir compte. Aussi, nous devons évaluer le pH des solutions avec la concentration en collagène mesurée par dosage. Quoiqu'il en soit, la charge nette maximale portée par le collagène serait de 281 à pH 1 (Cf. § 1.1.4). La densité linéique de charge le long de la molécule « vue de loin », ν, serait donc au maximum égale à 0,94 e/nm. La condition $\nu Q < 1$ pour les polyélectrolytes faiblement chargés est donc vérifiée dans tous les cas, puisque νQ vaut au plus 0,94×0,714 = 0,669. Nous pouvons donc nous placer dans le cadre de

††† NB : la longueur de Bjerrum est la distance à laquelle l'interaction électrostatique entre deux charges est comparable à l'énergie d'agitation thermique $k_B T$. Elle s'exprime ainsi : $Q = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_r k_B T}$. Nous la prenons égale à 0,714 nm dans l'eau à 25°C)

l'approximation de Debye-Hückel, dans laquelle le potentiel électrostatique s'exprime comme il suit :

$$\varphi_{DH} = \frac{2\nu Q K_0(\varkappa r)}{\varkappa a K_1(\varkappa a)} \qquad (\varphi_{DH} < 1) \qquad \textbf{(15)}$$

où $a = D/2$ est le rayon du cylindre, K_0 et K_1 les fonctions de Bessel modifiées de la seconde espèce, respectivement d'ordre 0 et d'ordre 1. On a aussi A' :

$$A'_{DH} = 2\pi\nu^2 Q\varkappa^{-1} g^{-1}(\varkappa a) \qquad \textbf{(16)}$$

Avec $g(\varkappa a) = (\varkappa a)^2 K_1^2(\varkappa a) e^{2\varkappa a}$. K_1 est la fonction de Bessel modifiée du premier ordre qui a été calculée à l'aide du logiciel Mathematica, et dont on peut également effectuer une estimation sur le site Wolfram[##].

Calcul de D_{eff} – Afin de bien nous rendre compte de l'influence de la double couche diffuse sur la transition isotrope/nématique, nous avons calculé le diamètre effectif du collagène pour différentes conditions comparables à celles de nos expériences. Si nous choisissons une concentration en collagène et le solvant (concentration initiale en acide acétique), la procédure est la suivante : de la concentration en collagène nous déduisons une estimation de la concentration en acide acétique, qui détermine le pH. Nous pouvons alors en déduire le nombre de charges ionisées sur le collagène et le nombre d'ions libres en solution, qui nous permet de calculer la longueur de Debye $\varkappa^{-1}$ (Equation 14). Si on se place dans l'approximation de Debye-Hückel, on calcule le diamètre effectif avec les équations 6 et 9. Un exemple de calcul est donné en annexe 6 et quelques valeurs représentatives sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Diamètre effectif du collagène en fonction de la concentration en collagène et de la concentration initiale en acide acétique.

	Concentration initiale en acide acétique		
Concentration en collagène	*5 mM*	*50 mM*	*500 mM*
5 mg/ml	22,41 nm	18,30 nm	12,45 nm
50 mg/ml	5,96 nm	5,73 nm	5,11 nm
100 mg/ml	3,99 nm	3,90 nm	3,63 nm

On voit que la double couche d'ions augmente fortement le diamètre apparent des molécules, ce qui a pour effet d'augmenter la divergence entre les valeurs prédites par le modèle d'Onsager rigide (purement géométrique) et nos valeurs expérimentales. En fait, le diamètre effectif varie peu en fonction de la composition du solvant ; c'est la concentration du collagène lui-même qui impose la force ionique du milieu dans la gamme de pH considérée.

http://functions.wolfram.com/webMathematica/FunctionEvaluation.jsp?name=BesselK

Le diamètre effectif peut donc prendre des valeurs très différentes et beaucoup plus importantes que celle du diamètre géométrique publiée dans la littérature (1,5 nm), ou même que celui déduit de la loi de dilution (1,65 nm). Comme le diamètre intervient au dénominateur dans le calcul des concentrations critiques (Equations 4), une augmentation d'un facteur 15 de sa valeur effective diminue d'autant la concentration critique prédite. Par exemple, alors que le modèle d'Onsager purement stérique prévoit une transition à 15,7 mg/ml, la prise en compte d'un diamètre effectif de 6 nm réduit la concentration critique à 3,92 mg/ml.

2.3.2 Prise en compte de la flexibilité des molécules

Les valeurs de concentrations à la transition déterminées grâce à l'approche théorique décrite ci-dessus sont encore bien en deçà de celles trouvées expérimentalement. Un paramètre supplémentaire doit être pris en compte dans nos calculs, qui provient du fait que la molécule de collagène est semi-flexible (§ 1.1.4). Or, même une faible flexibilité est susceptible d'augmenter les concentrations à la transition de façon significative[78]. En effet, elle augmente l'entropie de compaction nécessaire pour passer dans la phase nématique, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration à la transition.

Modèle numérique de Chen – Pour discuter de l'influence de la flexibilité sur la transition isotrope/nématique, nous nous baserons essentiellement sur la méthode numérique proposée par Chen[79], qui a minimisé l'expression de l'énergie libre modifiée par la flexibilité telle que proposée par Khokhlov et Semenov[80]. De cette minimisation, il en tire des expressions empiriques du paramètre d'ordre *S* et des concentrations $\overline{C}_i$ et $\overline{C}_n$ à la transition.
À savoir :

$$\overline{C}_i = \frac{a_1 a + a_2 a^2 + a_3 a^3}{1 + b_1 a^1 + b_2 a^2} \qquad \textbf{(17)}$$

$$W = \frac{a_1 a + a_2 a^2 + a_3 a^3}{1 + b_1 a^1 + b_2 a^2} \qquad \textbf{(18)}$$

$$S = \frac{a_1 a + a_2 a^2 + a_3 a^3}{1 + b_1 a^1 + b_2 a^2} \qquad \textbf{(19)}$$

sachant que *W* est la différence relative de densité entre la phase isotrope et la phase nématique :

$$W = \frac{\overline{C}_n}{\overline{C}_i} - 1 \qquad \textbf{(20)}$$

$\overline{C}$ est une concentration adimensionnelle telle que $\overline{C} = NL^2D/V$; pour retrouver la concentration en mg/ml, on appliquera donc la formule suivante (en exprimant les volumes en litres et les longueurs en dm) :

$$C = \frac{M\overline{C}}{N_a L^2 D_{(eff)}} \qquad \textbf{(21)}$$

Les paramètres a_i et b_i sont donnés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : paramètres des équations (16), (17) et (18)

	a_0	a_1	a_2	a_3	b_1	b_2	b_3
Equation 11 (C_i)	0,7922	8,8479	11,8593	32,7591	15,6956	34,2650	70,9379
Equation 12 (W)	0,2737	3,0357	3,0666	10,7859	26,8263	86,7892	143,145
Equation 13 (S)	4,1895	26,1020	66,0026	117,846	3,4806	9,0331	0

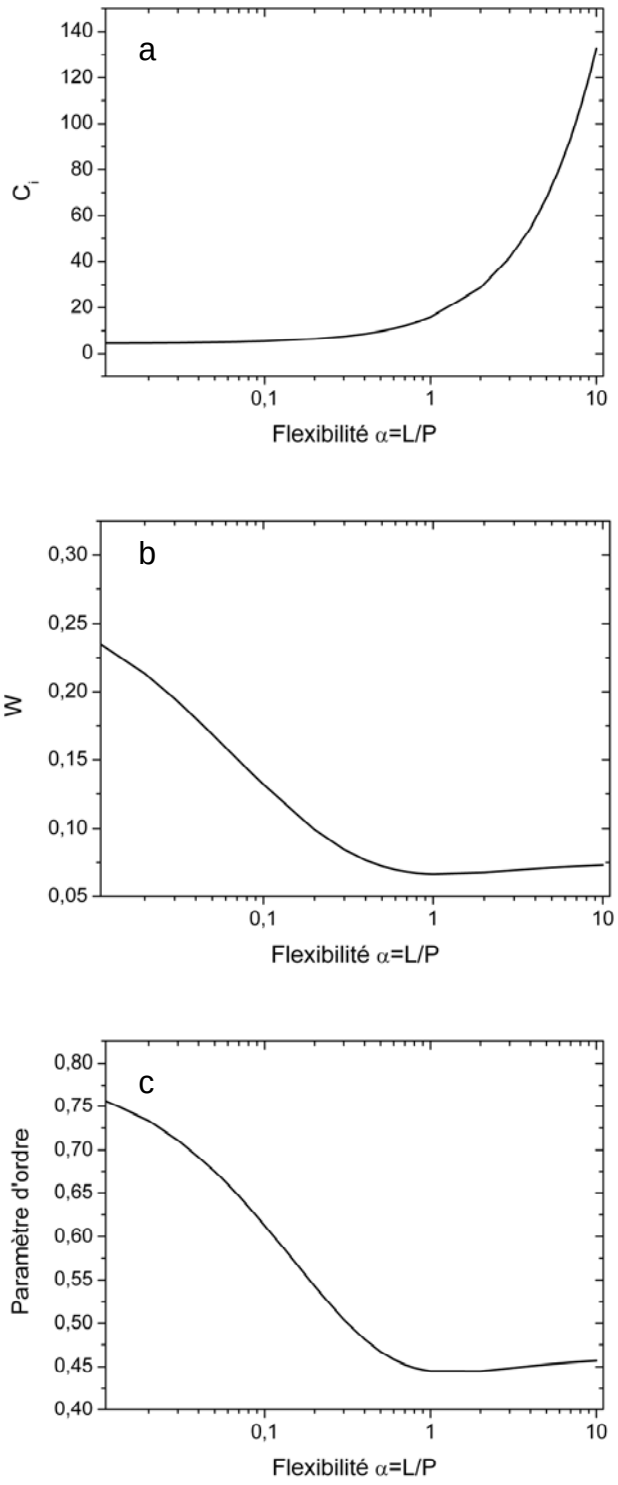


Figure 20 : Modélisation de (a) la concentration de limite de métastabilité nématique, (Equation 16); (b) la différence relative de densité entre la phase isotrope et la phase nématique (Equation 17) ; et (c) le paramètre d'ordre à la transition isotrope-nématique (Equation 18) en fonction de la flexibilité d'après la modélisation de Chen.

Le modèle de Chen décrit assez bien nos résultats expérimentaux (Tableau 3 et Figure 21). On voit que la flexibilité des particules a pour effet d'abaisser la valeur du paramètre d'ordre. Dans notre cas, il prévoit une valeur de 0,44 comparable à celle de 0,45 obtenue expérimentalement. Comme on le constate sur la Figure 20c, cette valeur est peu sensible à la variation de la flexibilité dès lors que la longueur de persistance est inférieure à la longueur des molécules.

Nous avons aussi calculé les concentrations critiques en tenant compte à la fois de la flexibilité et du diamètre effectif imposé par la force ionique du milieu. Le calcul est compliqué par le fait que, comme nous l'avons vu précédemment, le diamètre effectif varie fortement en fonction de la concentration en collagène, qui est le paramètre recherché. Il faut donc procéder par itérations en se donnant une concentration de départ arbitraire pour calculer D_{eff}, puis la concentration critique correspondante, jusqu'à ce que ces deux concentrations convergent. Nous donnons en annexe 6 un exemple détaillé de la procédure suivie. Une synthèse des résultats est présentée dans le Tableau 3 et sur la Figure 21.

Tableau 3 : Concentration C_i calculée avec le modèle numérique de Chen en fonction de la concentration initiale en acide acétique pour trois valeurs de la longueur de persistance trouvées dans la littérature.

	Rigide	*a = 1,88*	*a = 2,68*	*a = 5,26*	*Exp.*
	P = ∞	*P = 160 nm*	*P = 112 nm*	*P = 57 nm*	
D_{eff}(5 mM)	0,43 mg/ml	9,4 mg/ml	20,4 mg/ml	96,8 mg/ml	50-60 mg/ml
D_{eff}(50 mM)	0,79 mg/ml	12,2 mg/ml	24,2 mg/ml	101,7 mg/ml	60-80 mg/ml
D_{eff}(500 mM)	1,54 mg/ml	18,6 mg/ml	33,4 mg/ml	117,3 mg/ml	80-85 mg/ml
D = 1,5 nm	15,7 mg/ml	99,8 mg/ml	138,1 mg/ml	238,2 mg/ml	_

Les tendances obtenues à l'aide des valeurs calculées sont cohérentes avec celles observées expérimentalement. Les concentrations critiques augmentent avec la concentration en acide acétique. La prise en compte de la flexibilité rapproche les concentrations critiques théoriques de nos valeurs expérimentales. Il a été montré avec des suspensions de mutants de bactériophages de longueurs variables que les concentrations critiques dépendaient bien de la flexibilité. Cependant, à des faibles forces ioniques (< 60 mM), la dépendance vis-à-vis de la flexibilité diverge des modèles, dont celui de Chen. L'origine de cette divergence est essentiellement attribuée par les auteurs à un mauvais traitement de la contribution électrostatique, c'est-à-dire au calcul de D_{eff}.

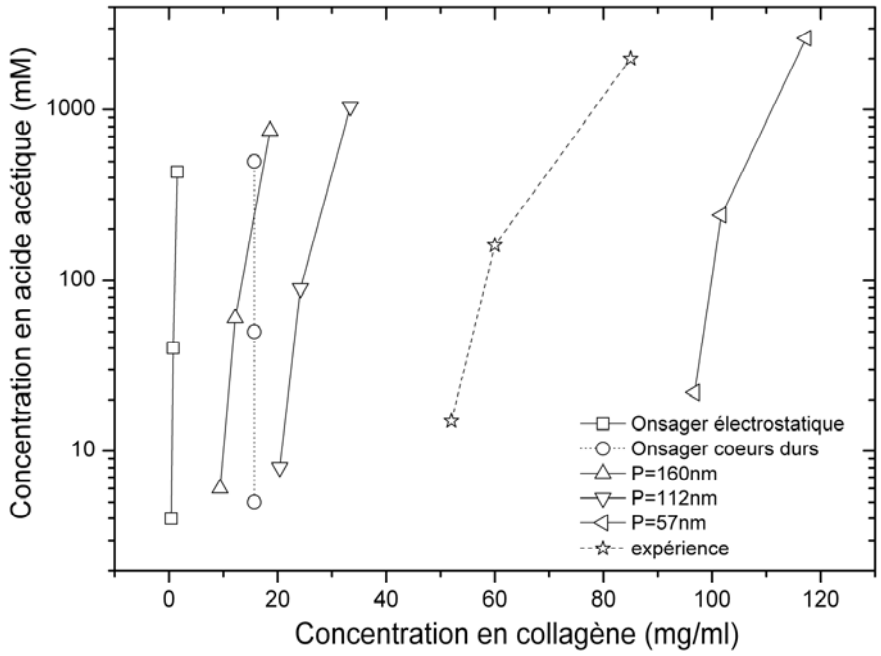


Figure 21 : Influence de la flexibilité sur la concentration critique de transition calculée dans le régime d'Onsager électrostatique : comparaison à l'expérience.

Pour améliorer la concordance entre nos valeurs expérimentales et les valeurs calculées, il faudrait mesurer précisément la valeur de la longueur de persistance dans nos conditions expérimentales. En effet, la longueur de persistance est très sensible au solvant et à la concentration[81], ce que reflète la variété des valeurs trouvées dans la littérature. La Figure 20a-b illustre la grande sensibilité des concentrations critiques à la flexibilité. Une mauvaise estimation de la longueur de persistance peut donc avoir un impact dramatique sur la prévision des concentrations critiques.

Largeur du fuseau biphasique – Une autre caractéristique de la transition isotrope/nématique que nous avons peu discutée jusqu'ici est la largeur du fuseau biphasique. Comme nous l'avons expliqué plus haut, sauf exception, nous n'avons pas pu observer de séparation de phases isotrope/nématique ; nous n'avons donc pu déterminer séparément C_i et C_n, mais seulement une valeur critique, elle-même assez peu précise compte tenu de la sensibilité de la méthode utilisée et de la précision du dosage. En effet, l'intensité observable de la lumière transmise due à la biréfringence dépend de l'épaisseur de l'échantillon observée. Elle était ici de 200 µm ; si nous avions utilisé des capillaires de 400 µm, il est possible que nous eussions détecté un seuil de transition un peu plus bas en concentration. En ce qui concerne le dosage, dans le domaine de concentration considéré, nous avons estimé la barre d'erreur à ±5 mg/ml, ce qui est l'ordre de grandeur du fuseau biphasique prévu par la théorie de Khokhlov et Semenov, soit ~7,5 mg/ml.

Or, sur la Figure 20b, nous voyons clairement que la flexibilité a aussi pour conséquence de réduire fortement la largeur du domaine de coexistence de phases.
Un autre paramètre influençant la largeur de ce faisceau est la longueur des particules ; plus ces dernières sont courtes, plus le faisceau est large. Tout concourt donc à démontrer que, pour notre système, ce fuseau de coexistence de phases est particulièrement réduit.

Addendum juillet 2007 – Nous avons très récemment découvert un nouveau signal de diffusion des rayons X aux très petits angles dans certains échantillons nématiques[§§§] (84 et 112 mg/ml) (Figure 22). Ce signal correspond dans l'espace direct à une distance d ~ 144-153 nm. Pour l'instant, l'interprétation de ce signal n'est pas fixée.
Comme cette distance correspond à la moitié de la longueur d'une triple hélice, il pourrait éventuellement s'agir du deuxième ordre du signal d'une phase lamellaire dont le premier ordre serait perdu sous la très intense diffusion en bord de piège. Malgré tout, l'absence de troisième ordre rend cette hypothèse peu probable.
Nous pourrions aussi attribuer ce signal à la présence en solution d'oligomères de 2-3 triples hélices, déjà observés par Silver[82] en diffusion quasi-élastique de la lumière (voir aussi les références citées). Il est intéressant de noter que cette distance correspond à peu près au double de la période caractéristique de 67 nm observée dans les fibrilles de collagène (Cf. Chapitre 4). Ce signal serait une première indication de la mise en place d'un ordre axial au sein même de la phase nématique.

[§§§] Notons que le pic de corrélation à q~1 nm^{-1} reste visible.

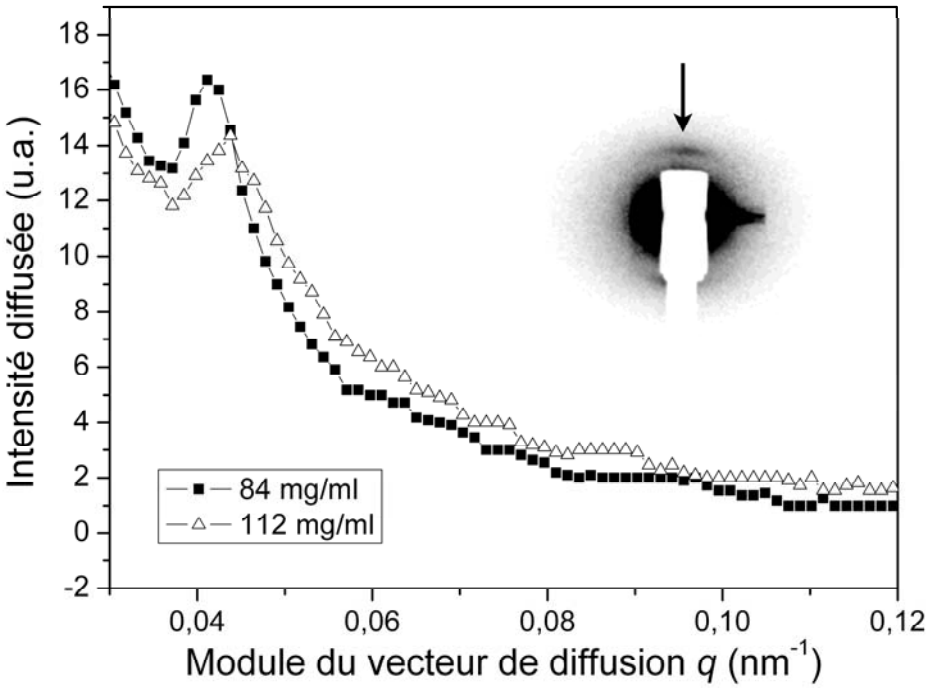


Figure 22 : Profil linéaire pris dans le sens de l'anisotropie du signal de diffusion des rayons X aux très petits angles observé dans des solutions nématiques à 84 et 112 mg/ml. Encart : cliché pour l'échantillon à 84 mg/ml. Le pic anisotrope est orienté perpendiculairement au signal de corrélation de la phase nématique.

Conclusion

Nous avons vérifié un certain nombre de comportements spécifiques des cristaux-liquides lyotropes dans les solutions concentrées de collagène. Les théories pour des particules allongées semi-flexibles avec un diamètre effectif contrôlé par les charges de surface décrivent et prédisent assez bien les caractéristiques de la transition isotrope/nématique dans ces solutions. Malgré cela, certains résultats posent encore quelques difficultés, résistent à l'interprétation et nécessiteraient sans doute une caractérisation physico-chimique plus fine. Il nous manque notamment une mesure précise de la longueur de persistance des triples hélices dans nos conditions. L'étape suivante serait notamment d'essayer de comprendre la relation qu'il existe entre la chiralité moléculaire et le pas cholestérique. Néanmoins, du point de vue expérimental, le collagène est loin d'être un système modèle permettant de modifier facilement les paramètres physico-chimiques. Notamment, la forte viscoélasticité des solutions au voisinage de la transition empêche de préparer des échantillons de concentration connue et de les insérer dans des capillaires sans perturber les textures cholestériques.

*

Du point de vue de la biologie fondamentale, se pose la question de savoir si ces résultats sont pertinents pour comprendre la morphogenèse *in vivo*. Sous cet angle, la principale critique à apporter à nos expériences est bien sûr que le collagène n'est pas soluble en conditions physiologiques. En revanche, R. Martin *et al.*[8,51] ont montré que le procollagène, précurseur du collagène soluble dans des conditions physiologiques, pouvait former des phases cristal-liquides biréfringentes, sans toutefois démontrer totalement sa nature cholestérique. Néanmoins, au vu des présents résultats obtenus *in vitro* à partir de collagène purifié, il semble peu probable que l'analogie existant entre la structure des tissus vivants et la structure de la phase cholestérique soit une simple coïncidence.

Au-delà même de la question de l'origine de l'ordre dans ces tissus biologiques et en particulier de la chiralité dans les tissus osseux, celle de la fonction de cette organisation mérite d'être posée. Ainsi, une structure en contreplaqué hélicoïdal est sans doute une façon astucieuse pour la nature de limiter la propagation de déchirures ou de fissures à travers le matériau[83,84]. S'il était possible de démontrer *in vivo* la présence d'une étape cristal-liquide qui précèderait la formation d'un tissu élastique et solide, quelles conséquences cela pourrait-il avoir dans la compréhension de pathologies liées à un agencement anormal de la matrice extracellulaire ?

Références du Chapitre 2

[1] Gabriel J.-C.P. et Davidson P. New Trends in Colloïdal Liquid Crystals Based on Mineral Moieties" Advanced Materials 12:1 (2000) 9-20

[2] Vroege G.J. et Lekkerkkerker H.N.W. "Phase Transition in Lyotropic Colloidal and Polymer Liquid Crystals" *Rep. Prog. Phys.* **55** (1992) 1241-1309

[3] Michot L.J., Bihannic I., Maddi S., Funari S.S., Baravian C., Levitz P., Davidson P. "Liquid-crystalline aqueous clay suspensions" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103** 44 (2006) 16101-16104

[4] Prost J., De Gennes P.G., "The Physics of Liquid Crystals" Oxford University Press, 2nd Edition (1993)

[5] Kléman M. et Lavrentovitch O.D. "Soft Matter Physics: An Introduction", Springer Verlag (2002)

[6] Mitov M. "Les Cristaux Liquides", PUF, Collection Que Sais-je ? (1998)

[7] Collings P.J. "Liquid Crystals: Nature's Delicate Phase of Matter" Second Edition (2001) Princeton University Press

[8] Martin R. "Les Propriétés d'Assemblages Cristallins Liquides du Procollagène" Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (1999)

[9] Livolant F. "Cholesteric Organization of DNA in vivo and in vitro" *Eur. J. Cell Biol.* **33** (1983) 300-311

[10] Livolant F. "Ordered Phases of DNA in vivo and in vitro" *Physica A* **176** (1991) 117-137

[11] Revol J.-F. et Marchessault R.H. "*In vitro* Chiral Nematic Ordering of Chitin Crystallites" *Int. J. Biol. Macromol.* **15** (1993) 329-335

[12] Belamie E., Davidson P., Giraud-Guille M.M. "Structure and Chirality of the Nematic Phase in α-Chitin Suspensions" *J. Phys. Chem. B.* **108**:39 (2004) 14991-15000

[13] Revol J.-F., Bradford H., Giasson J., Marchessault R.H., Gray D.G. "Helicoidal Self-ordering of Cellulose Microfibrils in Aqueous Suspensions" *Int. J. Biol. Macromol.* **14** (1992) 170-172

[14] Suzuki A., Maeda T., Ito T. "Formation of Liquid Crystalline Phase of Actin Filament Solutions and its Dependence on Filament Length as Studied by Optical Birefringence" *Biophys. J.* **59** (1991) 25-30

[15] Helfer H., Panine P., Carlier M.-F., Davidson P. "The Interplay between Viscoelastic and Thermodynamic Properties Determines the Birefringence of F-Actin Gels" *Biophys. J.* **89** (2005) 543-553

[16] Viamontes, J. Oakes P.W., Tang J.X. "Isotropic to Nematic Liquid Crystalline Phase Transition of F-Actin Varies from Continuous to First Order" *Phys. Rev. Lett.* **97** (2006) 118103

[17] Bawden F.C., Pirie N.W., Bernal J.D., Frankuchen I. "Liquid Crystalline Substances from Virus-infected Plants" *Nature* **138** (1936) 1051-1052

[18] Oldenbourg R., Wen X., Meyer R.B., Caspar D.L.D. "Orientational Distribution Function in Nematic Tobacco-Mosaic-Virus Liquid Crystals Measured by X-ray Diffraction" *Phys. Rev. Lett.* **61**:16 (1988) 18-51-1854

[19] Lapointe J., Marvin D.A. "Filamentous Bacterial Viruses: 8. Liquid-crystals of Fd" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **19** (1973) 269

[20] Tang J.X. et Fraden S. "Isotropic-cholesteric Phase-transition in Colloidal Suspensions of Filamentous Bacteriophage fd" *Liq. Cryst.* **19** (1995) 459-467

[21] Dogic Z. et Fraden S. "Ordered Phases of Filamentous Viruses" *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**:1 (2006) 47-55

[22] Purdy K. et Fraden S. "Isotropic-cholesteric Phase Transition of Filamentous Virus Suspensions as a Function of Rod Length and Charge" *Physical Review E* **70** (2004) 061703

[23] Dogic Z., Purdy K.R., Grelet E., Adams M., Fraden S. "Isotropic-nematic Phase Transition in Suspenions of Filamentous Virus and the Neutral Polymer Dextran" *Phys. Rev. E* **69** (2004) 051702

[24] Purdy K.R., Varga S., Galindo A., Jackson G. Fraden S. "Nematic Phase Transitions in Mixtures of Thin and Thick Colloidal Rods" *Phys. Rev. Lett.* **94**:5 (2005) 057801/1-4

[25] Bouligand Y. "Twisted Fibrous Arrangements in Biological Materials and Cholesteric Mesophases" *Tissue Cell* **4** (1978) 189-217

[26] Murthy N.S. "Liquid Crystallinity in Collagen Solutions and Magnetic Orientation of Collagen Fibrils" *Biopolymers* **23** (1984) 1261-1267

[27] Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen" *Biology of the Cell* **67** (1989) 97-101

[28] Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystallinity in Condensed Type I Collagen Solutions – A Clue to the Packing of Collagen in Extracellular Matrices" *J. Mol. Biol.* **224** (1992) 861-873

[29] Cowin S.C. "Do liquid crystal-like flow processes occur in the supramolecular assembly of biological tissues?" *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* **119** (2004) 155-162

[30] Belamie E., Mosser G., Gobeaux F., Giraud-Guille M.-M. "Possible Transient Liquid Crystal Phase During the Laying Out of Connective Tissues: alpha-Chitin and Collagen as Models" *J. Phys.: Condens. Matter* **18** (2006) 115-129

[31] Onsager L. "The Effects of Shape on the Interaction of Colloidal Particle" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 627-659

[32] Grelet E., Fraden S. "What Is the Origin of Chirality in the Cholesteric Phase of Virus Suspensions ?" *Phys. Rev. Lett.* **90** 19 (2003) 198302-1

[33] Tombolato F., Ferrarini A., Grelet E. "Chiral Nematic Phase of Suspensions of Rodlike Viruses: Left-Handed Phase Helicity from a Right-Handed Molecular Helix" *Phys. Rev. Lett.* **96**:25 (2006) 258302

[34] Straley J.P. "Frank Elastic Constants of the Hard-rod Liquid Crystal" *Phys. Rev. A* **8**:4 (1973) 2181-3

[35] Straley J.P. "Theory of Piezoelectricity in Nematic Liquid Crystals, and of the Cholesteric Ordering" *Phys. Rev. A* **14**:5 (1976) 1835-41

[36] Harris A.B., Kamien R.D., Lubensky T.C. "Microscopic Origin of Cholesteric Pitch" *Phys. Rev. Lett.* **78**:8 (1997) 1476-1479 + erratum: *Phys. Rev. Lett.* **78**:14 (1997) 286

[37] Oodijk T. "Pitch of a Polymer Cholesteric" *J. Phys. Chem.* **91**:23 (1987) 6060-2

[38] Kornyshev A.A. et Leikin S. "Theory of Interaction Between Helical Molecules" *J. Chem. Phys.* **107**:9 (1997) 3656-3674

[39] Kornyshev A.A. et Leikin S. "Twist in Chiral Interaction between Biological Helices" *Phys. Rev. Lett.* **84**:11 (2000) 2537-2540

[40] Prost J., De Gennes P.G., "The Physics of Liquid Crystals" Oxford University Press, 2nd Edition (1993) 59-63

[41] Stroobants A., Lekkerkerker H.N.W., Odijk Th., "Effect of Electrostatic Interaction on the Liquid Crystal Phase Transition in Solutions of Rodlike Polyelectrolytes" *Macromolecules* **19** (1986) 2232-2238

[42] Mosser G., Anglo A., Helary C., Bouligand Y., Giraud-Guille M.-M. "Dense Tissue-like Collagen Matrices Formed in Cell-free Conditions" *Matrix Biol.* **25** (2006) 3-13

[43] Nishihara T. et Doty P. "The Sonic Fragmentation of Collagen Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (1958) 411-417

[44] Giraud-Guille M.-M., Besseau L., Herbage D., Gounon P. "Optimization of Collagen Liquid Crystalline Assemblies: Influence of Sonic Fragmentation" *J. Struct. Biol.* **113** (1994) 99-106

[45] Larson R.G. "The structure and Rheology of Complex Fluids" , Oxford University Press, New York (1998) p. 515

[46] Han W.H. et Rey A.D. "Theory and Simulation of Optical Banded Textures of Nematic Polymers during Shear Flow" *Macromolecules* **28** (1995) 8401-8405

[47] Fried F. et Sixou P. "Bands and Torsads Textures in Films and Threads of Hydroxypropyl Cellulose" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **158B** (1988) 163-184

[48] Livolant F., "Precholesteric Liquid Crystalline States of DNA" *J. Physique* **48** (1987) 1051-1066

[49] Maeda H. "An Atomic Force Microscopy Study of Ordered Molecular Assemblies and Concentric Ring Patterns from Evaporating Droplets of Collagen Solutions" *Langmuir* **15** (1999) 8505-8513

[50] Maeda H. "Observation of Spatially Rythmic Patterns from Evaporating Collagen Solution Droplets" *Langmuir* **16** (2000) 9977-9982

[51] Martin R. Farjanel J., Eichenberger D., Colige A., Kessler E., Hulmes D.J.S., Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Ordering of Procollagen as a Determinant of Three-Dimensional Extracellular Matrix Architecture" *J. Mol. Biol.* **301**:1 (2000) 11-17

[52] Kiss G. et Porter R.S. "Rheo-Optical Studies of Liquid Crystalline Solutions of Helical Polypeptides" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **60** (1980) 267-280

[53] Lonberg F., Fraden S., Hurd A.J., Meyer R.E. "Field-Induced Transient Periodic Structures in Nematic Liquid Crystals: The Twist-Fréedericksz Transition" *Phys. Rev. Lett.* **52**:21 (1984) 1903-1906

[54] Fincher C.R. "Field-Induced Textures and Elastic Constants of Nematic Polymers" *Macromolecules* **19** (1986) 2431-2435

[55] Diamant J., Keller A., Baer E., Litt M., Arridge R.G.C. "Collagen: Ultrastructure and its Relation to Mechanical Properties as a Function of Ageing" *Proc. R. Soc. Lond. B* **180** (1972) 293-315

[56] Duglosz J., Gathercole L.J., Keller A. "Transmission Electron Microscope Studies and Their Relation to Polarizing Optical Microscopy in Rat Tail Tendon" *Micron* **9** (1978) 71-82

[57] Giraud-Guille M.-M. et Besseau L. "Banded Patterns in Liquid Crystalline Phases of Type I Collagen : Relationship with Crimp Morphology in Connective Tissue Architecture" *Connect. Tissue Res.* **37** (1997) 183-193

[58] Wang J. et Labes M.M. "Control of the Anisotropic Mechanical Properties of Liquid Crystal Polymer Films by Variations in Their Banded Texture" *Macromolecules* **25** (1992) 5790-5793

[59] Panine P., Gradzielski M., Narayanan T. "Combined Rheometry and Small-Angle X-Ray Scattering" *Rev. Sci. Instrum.* **74** (2003) 2451-2455

[60] Orts W.J., Godbout L., Marchessault R.H., Revol J.-F. "Enhanced Ordering of Liquid Crystalline Suspensions of Cellulose Microfibrils: A Small Angle Neutron Scattering Study" *Macromolecules* **31** (1998) 5717-5725

[61] Pelletier O., Bourgaux C., Diat O., Davidson P., Livage J. "A Biaxial Nematic Gel Phase in Aqueous Vanadium Pentoxide Suspensions" *European Physical Journal B* **12** :4 (1999) 541-546

[62] Lemaire B. J., Davidson P., Ferré J., Jamet J.P.; Panine P., Dozov I., Jolivet J.P. "Outstanding Magnetic Properties of Nematic Suspensions of Goethite (α-FeOOH) Nanorods" *Physcial Review Letters* **88**:12 (2002) 125507-1

[63] Groot L.C.A., Kuil M.E., Leyte J.C., Van Der Maarel J.R.C., Heenan R.K., King S.M., Jannick G. "Neutron Scattering Experiments on magnetically aligned crystalline DNA fragment solutions" *Liquid Crystals* **17** 2 (1994) 263-276

[64] Torbet J., Ronzière M.-C. "Magnetic Alignment of Collagen during Self-assembly" *Biochem. J.* **219** (1984) 1057-1059

[65] Berret J.-F., Roux D.C., Porte G. "Isotropic-to-Nematic Transition in Wormlike Micelles Under Shear" *Journal de Physique* **4**:8 (1994) 1261-1279

[66] Berret J.-F., Roux D.C., Porte G. "Shear-Induced Isotropic-to-Nematic Phase-Transition in Equilibrium Polymers" *Europhysics Letters* **25**:7 (1994) 521-526

[67] Wang L. et Bloomfield V.A. "Small-Angle X-ray Scattering of Semidilute Rodlike DNA Solutions: Polyelectrolyte Behavior" *Macromolecules* **24** (1991) 5791-5795

[68] Davidson P., Petermann D., Levelut A.M. "The measurement of the nematic order parameter by x-ray scattering reconsidered" *J. Phys. II (France)* **5** 1 (1995) 113-131

[69] Purdy K.R., Dogic Z., Fraden S., Rühm A., Lurio L., Mochrie S.G.J "Measuring the nematic order of suspensions of colloidal fd virus by x-ray diffraction and optical birefringence" *Phys. Rev. E* **67** (2003) 031708

[70] Hagenbüchle M., Weuerich B., Deggelmann M., Graf C., Krause R., Maier R.R., Schulz S.S., Klein R., Weber R. "Static Light Scattering by Aqueous Solutions of Rodlike fd-Virus Particles" *Physica A* **169** (1990) 29-41

[71] Maier E.E., Krause R., Deggelmann, Hagenbüchle, Weber R., Fraden S. "Liquidlike Order of Charged Rodlike Particle Solution" *Macromolecules* **25** (1992) 1125-1133

[72] Keates P., Mitchell G.R., Peuvrel E. "Local Structural Correlations in Anisotropic Solutions of Hydroxypropylcellulose" *Polymer* **33** (1992) 3298-3301

[73] De Gennes P.G., Pincus P., Velasco R.M., Brochard F. "__" *J. Phys. (Paris)* **37** (1976) 1461-1473

[74] Borsali R., Rinaudo M., Noirez L. "Light Scattering and Small-Angle Neutron Scattering from Polyelectrolyte Solutions: The Succinoglycan" *Macromolecules* **28** (1995) 1085-1088

[75] Chapot D., Bocquet L. et Trizac E. "Interaction Between Charged Anisotropic Macromolecules: Applications to Rodlike Polyelectrolytes" *J. Chem. Phys.* **120**:8 (2004) 3969-3982

[76] Chapot D., Bocquet L. et Trizac E. "Electrostatic Potential Around Charged Finite Rodlike Macromolecules: Nonlinear Poisson-Boltzmann Theory" *Journal of Colloid and Interface Science* **285** (2005) 609-618

[77] Sato T. et Teramoto A. "Pertubation Theory of Isotropic-Liquid-Crystal Phase Equilibria in Polyelectrolyte Solutions" *Physica A* **176** (1991) 72-86

[78] Khokhlov A.R. et Semenov A.N. "Liquid-Crystalline Ordering in Solutions of Semiflexible Macromolecules with Rotational-Isomeric Flexibility" *Macromolecules* **17** (1984) 2678-2685

[79] Chen Z.Y. "Nematic Ordering in Semiflexible Polymer Chains" *Macromolecules* **26** (1993) 3419-3423

[80] Khokhlov A.R. et Semenov A.N. "Liquid-crystalline Ordering in the Solution of Partially Flexible Macromolecules" *Physica A* **112** (1982) 605-614

[81] Barrat J.-L. et Joanny J.-F. "Theory of Polyelectrolyte Solutions" *Advance in Chemical Physics* **94** (1996) 1-66

[82] Silver F.H. et Trelstad R.L. "Type I Collagen in Solution – Structure and Properties of Fibril Fragments" *J. Biol. Chem.* **255**:19 (1980) 9427-9433

[83] Giraud-Guille M.-M. "Plywood Structure in Nature" *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **3** (1998) 221-227

[84] Peterlik, Roschger P., Klaushofer K., Fratzl P. "From Brittle to Ductile Fracture of Bone" *Nature Materials* **5** (2006) 52-55

ANNEXE 5 : Influence du cisaillement sur le signal de diffusion nématique.

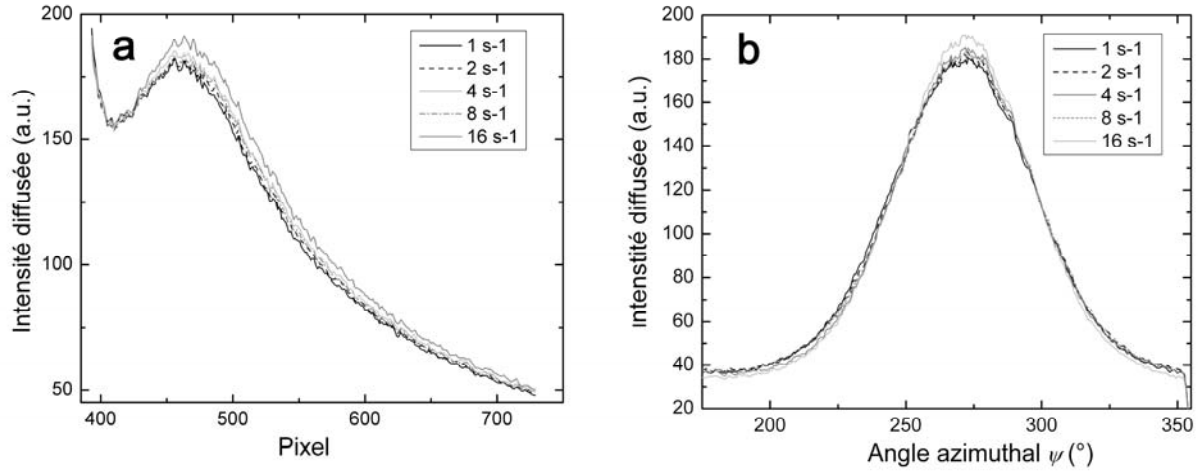


Figure 1 : (a) Profil linéaire du signal de diffusion nématique pris dans le sens de l'anisotropie mesuré à différents taux de cisaillement. (b) Dispersion angulaire du signal de diffusion nématique. Concentration en collagène = 90 mg/ml. Le cisaillement ne modifie ni la position du pic de corrélation, ni la dispersion angulaire (donc le paramètre d'ordre calculé).

ANNEXE 6 :
Exemple de calcul d'une concentration à la transition avec le modèle de Chen en tenant compte du diamètre effectif.

C_{Coll} (mg/ml)	C_{AA} (M)	pH	n_s	z_p	υ_{Coll}	n_p	κ^{-1}	κ*a	$K_1(\kappa$*a)	g(κ*a)	A_{DH}	D_{eff}	C_i(mg/ml)
5	0,50	2,53	0,003	277,76	0,93	0,00	3,57	0,21	4,53	1,38	9,96	12,5	31,59
31,59	1,00	2,37	0,004	278,69	0,93	0,00	2,07	0,36	2,45	1,64	4,88	6,37	61,78
61,78	1,58	2,28	0,005	279,15	0,93	0,00	1,57	0,48	1,76	1,83	3,34	4,6	85,47
85,47	2,03	2,22	0,006	279,37	0,93	0,00	1,36	0,55	1,46	1,95	2,72	3,92	100,40
100,4	2,31	2,19	0,006	279,47	0,93	0,00	1,27	0,59	1,33	2,01	2,45	3,62	108,70
109,7	2,49	2,18	0,007	279,52	0,93	0,00	1,22	0,61	1,26	2,05	2,32	3,46	113,53
113,53	2,56	2,17	0,007	279,54	0,93	0,00	1,20	0,62	1,23	2,07	2,26	3,41	115,45
115,45	2,60	2,17	0,007	279,55	0,93	0,00	1,19	0,63	1,22	2,08	2,24	3,38	116,39
116,39	2,61	2,17	0,007	279,56	0,93	0,00	1,19	0,63	1,22	2,08	2,23	3,37	116,85
116,85	2,62	2,17	0,007	279,56	0,93	0,00	1,19	0,63	1,21	2,08	2,22	3,36	117,08
117,08	2,63	2,17	0,007	279,56	0,93	0,00	1,18	0,63	1,21	2,08	2,22	3,36	117,19
117,19	2,63	2,17	0,007	279,56	0,93	0,00	1,18	0,63	1,21	2,08	2,22	3,35	117,24
117,24	2,63	2,17	0,007	279,56	0,93	0,00	1,18	0,63	1,21	2,08	2,21	3,35	117,27
117,27	2,63	2,17	0,007	279,56	0,93	0,00	1,18	0,63	1,21	2,08	2,21	3,35	117,28
117,28	2,63	2,16	0,007	279,56	0,93	0,00	1,18	0,63	1,21	2,08	2,21	3,35	117,29
117,29	2,63	2,16	0,007	279,56	0,93	0,00	1,18	0,63	1,21	2,08	2,21	3,35	**117,29**

Il s'agit d'un calcul itératif : nous choisissons une concentration arbitraire en collagène (ici 5 mg/ml). Dans nos conditions expérimentales, cette concentration impose la concentration de l'acide acétique (seule la concentration initiale en acide acétique est imposée par l'expérimentateur).

$$C_{AA}=0{,}0189744*C_{Coll}+0{,}405 \qquad \text{(Colonne 2)}$$

La concentration en acide acétique impose, elle, le pH de la solution et la concentration en ions libres n_s en solution.

$$pH=\frac{1}{2}\left(pK_a-\log C_{AA}\right) \qquad \text{(Colonne 3)}$$

$$n_s=10^{-pH} \qquad \text{(Colonne 4)}$$

Connaissant le pH, nous pouvons calculer la charge z_p portée par le collagène, en sommant la charge portée par chacun des peptides le composant.
z_p *: Charge Coll* : calculée avec Peptide Charge Calculator III (www.usm.maine.edu/~rhodes/Goodies/PeptChg.xls)
Nous en déduisons alors la densité linéïque de charge υ_{Coll} et la densité de charge n_p du polyélectrolyte en solution :

$$\upsilon_{Coll} = \frac{z_p}{300nm} \qquad \text{(Colonne 6)}$$

$$n_p = \frac{C_{AA}}{M_{Coll} * N_A} \qquad \text{(Colonne 7)}$$

Nous pouvons maintenant calculer la longueur de Debye $\varkappa^{-1}$ dans la solution, avec Q, la longueur de Bjerrum :

$$\varkappa^{-1} = \frac{1}{\sqrt{8\pi Q(2n_s + n_p z_p)}} \qquad \text{(Colonne 8)}$$

Vient en suite le calcul du diamètre effectif du collagène $D_{\text{eff}}=D(1+\delta)$ (colonne 13), avec $\delta = \frac{\ln A' + \gamma + \ln 2 - \frac{1}{2}}{\varkappa D}$, que nous avons décomposé en calculant séparément la « variable » $\varkappa^*a$ (colonne 9, avec a le rayon nu du collagène), la fonction de Bessel modifiée du 1er ordre* $K_1(\varkappa^*a)$ (colonne 10) et la fonction $g(\varkappa^*a)=z^2K_1^2(\varkappa^*a)e^{2\kappa^*a}$ (colonne 11), qui rentrent dans l'expression de la constante A', ici en tenant compte de l'approximation de Debye-Hückel pour les polyélectrolyte faiblement chargés ($\upsilon Q<1$) :

$$A'_{DH} = 2\pi v^2 Q\varkappa^{-1} g^{-1}(\varkappa a) \qquad \text{(Colonne 12)}$$

Enfin, on calcule la concentration prévue par le modèle numérique de Chen, en tenant compte de la flexibilité imposée par la longueur de persistance choisie :

$$\overline{C_i} = \frac{a_1 a + a_2 a^2 + a_3 a^3}{1 + b_1 a^1 + b_2 a^2} \quad \text{(ici, sous forme adimensionnelle)}$$

$$C_i(mg/ml) = \frac{M\overline{C}}{N_a L^2 D_{(eff)}} \qquad \text{(Colonne 14)}$$

Si cette dernière valeur n'est pas cohérente avec la valeur initiale (qui nous a servi à déterminer le diamètre effectif), il faut recommencer la séquence avec elle, jusqu'à la convergence de C_{Coll} et C_i. Ici, en prenant la longueur de persistance égale à 57 nm et la concentration initiale en collagène égale à 500 mM, on trouve la valeur $\boldsymbol{C_i}$**=117 nm**.

* On peut en trouver une estimation sur le site : http://functions.wolfram.com/webMathematica/FunctionEvaluation.jsp?name=BesselK

Chapitre 3

Caractérisation rhéologique de solutions de collagène - gélification

Weepe you no more, sad fountaines
What need you flowe so fast?
- John Dowland[*]

Dans le chapitre précédent, nous avions constaté la difficulté pour la phase cholestérique à se reformer après une perturbation (manipulation avec une spatule, aspiration dans un capillaire). Ici, nous avons cherché à caractériser et à interpréter plus en détails les propriétés rhéologiques des solutions de collagène, l'objectif étant de relier les propriétés macroscopiques mesurées à des modèles à l'échelle moléculaire. Les principaux résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus en régime oscillant dans une cellule de cisaillement « cône-plan », qui permet de sonder la réponse viscoélastique des solutions sans en modifier la structure. Nous avons étudié une large gamme de concentrations, allant de 5 à 300 mg/ml, dans laquelle les modules visqueux et élastiques augmentent beaucoup. Ces dernières expériences ont été menées grâce à l'expertise de Sophie Asnacios (Laboratoire Matière et Systèmes Complexes).

[*] No. XV from The Third and Last Booke of Songs or Aires (1603)

3.1 Généralités

La rhéologie est la partie de la mécanique qui étudie l'écoulement et la déformation (*strain*) des matériaux sous l'action de contraintes (*stress*)[†]. Une contrainte σ correspond à une force appliquée F rapportée à une surface S et se mesure en Pascals (Pa) :

$$\sigma = \frac{F}{S} \qquad \textbf{(1)}$$

et la déformation γ est un rapport de longueurs qui n'a, par conséquent, pas d'unité :

$$\gamma = \frac{\Delta x}{\Delta z} \qquad \textbf{(2)}$$

En réponse à une contrainte appliquée σ, on peut décrire deux comportements idéaux :

- d'une part les solides purement élastiques (ou hookéens), dont la déformation γ est proportionnelle à la contrainte σ qui leur est imposée :

  $$\sigma = G\gamma \qquad \textbf{(3)}$$

  Ce comportement peut être modélisé par un ressort de raideur $k = G$.
- d'autre part les liquides purement visqueux (ou newtoniens) qui s'écoulent (donc se déforment infiniment) lorsqu'une contrainte constante leur est appliquée :

  $$\sigma = \eta_{app}\dot{\gamma} \qquad \textbf{(4)}$$

  où η_{app} est la viscosité apparente qui s'exprime en Pascals × seconde (Pa.s) et $\dot{\gamma} = d\gamma/dt$ le taux de cisaillement qui s'exprime en s^{-1}.

Dans la réalité, les matériaux ont souvent un comportement intermédiaire. On parle alors de matériaux viscoélastiques ; d'un point de vue expérimental et théorique les déformations oscillantes de fréquence[‡] ω sont extrêmement importantes pour la caractérisation de ces fluides. Le comportement d'un corps viscoélastique peut être appréhendé en étudiant son module élastique complexe qui relie sa déformation à la contrainte qui lui est imposée :

$$\sigma(t) = \overline{G}(\omega) \times \gamma(t) \qquad \textbf{(5)}$$

où $\sigma(t)$ est la contrainte appliquée sinusoïdale, $\gamma(t)$ la réponse en déformation et $\overline{G}(\omega)$ le module de rigidité (viscoélastique) complexe, soit en notation complexe :

---

† En principe, on peut indifféremment imposer une contrainte pour mesurer la déformation correspondante ou l'inverse. Cependant, suivant le principe de construction des rhéomètres, l'une ou l'autre des procédures peut s'avérer plus précise. Dans notre cas, nous travaillerons de préférence en contrainte imposée.

‡ Rigoureusement parlant, ω (rad.s^{-1}) est une pulsation qui est reliée à la fréquence f (s^{-1}) par la relation $\omega = 2\pi f$. Dans la pratique, nous parlerons de la fréquence en lui donnant la valeur numérique de pulsation pour rester conforme à la littérature.

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{i\omega t} \qquad \textbf{(6)}$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 e^{i\omega t + \delta} \qquad \textbf{(7)}$$

$$\overline{G}(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \qquad \textbf{(8)}$$

Il faut aussi noter que la relation (5) n'est valable que dans la limite des faibles déformations (ou régime linéaire). Cela signifie que l'amplitude de la déformation ne doit pas modifier la structure.

- La partie réelle du module complexe $\overline{G}(\omega)$, *G'*, se rapporte à la composante en phase de la relation contrainte-déformation et elle est proportionnelle à l'énergie élastique stockée par unité de volume du matériau pendant un cycle de déformation. On l'appelle donc le module de conservation (*storage modulus*) ou, plus simplement, le module élastique.

- La partie imaginaire du module complexe, *G"*, est le module de perte (*loss modulus*), ou module visqueux, associé à l'énergie de dissipation visqueuse. Le rapport de l'énergie dissipée à l'énergie conservée est donné par l'angle de déphasage δ, exprimé par :

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'} \qquad \textbf{(9)}$$

Pour un solide élastique parfait nous avons les relations

$$G'(\omega) = G$$

$$G''(\omega) = 0$$

Et pour un liquide visqueux newtonien :

$$G'(\omega) = 0$$

$$G''(\omega) = \eta\omega$$

3.1.1 Comportement rhéologique et structure microscopique : modèles moléculaires

Ecoulement de solutions de polymères linéaires – Le comportement rhéologique des solutions de macromolécules est la conséquence des interactions moléculaires. Ces interactions dépendent évidemment de la structure chimique des macromolécules en question, mais aussi de leur concentration. On définit la concentration d'enchevêtrement *C** comme la concentration à partir de laquelle les chaînes des molécules isolées vont être suffisamment proches pour rentrer en contact. On l'estime avec de simples critères géométriques :

$$C^* = \frac{M}{R_g^3 N_A} = \frac{M}{L^3 N_A} = 0{,}0185 \text{ mg/ml} \qquad \textbf{(10)}$$

où R_g est le rayon de giration de la molécule ; dans le cas du collagène qui est une molécule allongée assimilable en première approximation à un bâtonnet, nous avons simplement pris sa longueur L = 300 nm. M et N_a sont respectivement la masse molaire du collagène et le nombre d'Avogadro ($6{,}022\times10^{23}$ mol^{-1}).

En régime dilué ($C < C^* = 0{,}0185$ mg/ml), le cisaillement des solutions a un effet d'entraînement sur les macromolécules. Si les molécules sont rigides, cet entraînement va simplement se traduire par leur rotation autour de leur centre de gravité. Si elles sont flexibles (et linéaires), elles vont s'étendre et se déployer dans le sens de l'écoulement. La viscosité résulte alors de la résistance à cet entraînement, principalement due à l'agitation thermique qui va avoir un effet de désorientation.

En régime plus concentré ($C > C^*$), les enchevêtrements vont être source d'élasticité. Le mouvement des chaînes est limité par la présence des autres chaînes autour d'elles. Comme elles ne peuvent s'interpénétrer, chacune d'entre elles est confinée à l'intérieur d'un tube ; les mouvements latéraux sont donc très contraints, mais la chaîne peut toujours « ramper » le long du tube. A l'intérieur du tube, le comportement des chaînes est purement visqueux et soumis au mouvement brownien.

Gélification – Un gel possède les propriétés mécaniques d'un solide, même si sa structure est désorganisée et peut contenir une grande fraction volumique de solvant liquide. Il s'agit en fait d'un état hors équilibre thermodynamique, dans lequel la mobilité moléculaire est conservée, mais pas les mouvements à grande échelle. Cette coexistence d'un état liquide à l'échelle locale, et d'une résistance à l'écoulement, est assurée par des connections mécaniques formant un réseau entre des particules solubilisées[1]. Suivant la nature de ces connections, on distingue les gels chimiques des gels physiques. Les premiers sont réticulés par des liaisons covalentes. Ce sont par exemple les résines, les oxydes de silice, ou oxydes métalliques, et les caoutchoucs vulcanisés. Les gels physiques sont maintenus par des liaisons plus faibles comme des interactions électrostatiques entre charges opposées, de van der Waals, ou encore des liaisons hydrogène qui peuvent souvent être rompues par chauffage modéré. C'est par exemple le cas de la gélatine, pour laquelle une solution homogène peut être obtenue à partir d'environ 40°C. Les chaînes α libérées par la dénaturation thermique des triples hélices de collagène peuvent cependant se réassocier localement lorsque la température est abaissée. Les petits domaines hélicoïdaux ainsi rétablis constituent les nœuds de réticulation d'un réseau élastique (Cf. Chapitre 1, § 1.1.3).

Dans le cas qui nous intéresse ici, celui de solutions de collagène natif, c'est-à-dire intégralement sous forme de triples hélices, il faut bien distinguer deux types de gélification. Tout

d'abord la gélification physique des solutions acides denses, provoquée par la multiplication des « enchevêtrements »[§] entre les triples hélices et qui est l'objet de ce chapitre. Par ailleurs, nous nous intéresserons au chapitre suivant à la gélification induite par remontée de pH, habituellement appelée « fibrillogenèse », où des fibrilles très organisées forment un réseau très dense de points de réticulation. Il ne s'agit alors plus du tout de solutions, mais bien de gels dont l'élasticité est comparable à celle de la peau. Bien entendu, ces deux phénomènes peuvent être intimement liés, notamment lorsqu'un gel élastique est formé par neutralisation d'une solution concentrée, elle-même viscoélastique. Dans le présent chapitre, nous nous intéresserons donc aux propriétés rhéologiques des solutions acides. Pour des études rhéologiques au cours de la fibrillogenèse, nous pouvons par exemple renvoyer le lecteur aux travaux de Newman *et coll.*[2-4]. Mentionnons aussi une intéressante analyse comparée des mécanismes de gélification de la gélatine et de la fibrillogenèse par M. Djabourov *et coll.*[5]. Enfin, il existe aussi des études rhéologiques de réseaux moléculaires constitués de fibrilles de collagène et de protéoglycanes, utilisés comme modèles de matrice extracellulaire[6,7].

Propriétés rhéologiques des polymères cristaux-liquides nématiques[8] – Du point de vue rhéologique, la formation d'une phase cristal-liquide nématique n'est pas un phénomène anodin, et se traduit par des comportements complexes, variant parfois considérablement suivant le régime de cisaillement considéré. Bien que ces propriétés ne soient que partiellement comprises, certaines caractéristiques sont bien décrites.

Qu'il s'agisse de polymères thermotropes ou lyotropes, la transition isotrope/nématique est marquée par une chute de la viscosité (Figure 1) ; en effet, on se représente bien que l'alignement des molécules facilite le glissement des unes par rapport aux autres. Néanmoins, cela implique que cet effet soit plus marqué que l'élévation de la concentration (pour un CL lyotrope) ou que la baisse de la température (pour un CL thermotrope) à l'origine de la transition, deux paramètres qui ont classiquement pour effet d'augmenter la viscosité.

Par ailleurs, les courbes d'écoulement $\eta = f(\dot{\gamma})$ des polymères cristaux liquides présentent théoriquement trois régions distinctes (Figure 2), bien qu'elles ne soient pas nécessairement accessibles expérimentalement pour tous les systèmes étudiés. En particulier, la région II est un « plateau newtonien » et les régions I et III des régimes de rhéofluidification à (respectivement) bas et haut taux de cisaillement.

L'existence de la région I est principalement attribuée au caractère cristal-liquide des solutions, sans que les mécanismes soient clairement expliqués. Dans la région II, c'est l'effet de l'élasticité

[§] Le terme « enchevêtrements » peut ici aussi bien désigner la gêne stérique qui existe entre les différentes chaînes polymères que les connexions à durée de vie limitée dues à des liaisons faibles.

de la texture de défauts qui domine. En effet, une solution nématique macroscopique est en fait un polydomaine plein de lignes de disinclinaisons et par ailleurs le cisaillement en crée d'autres ; aussi, le temps pour qu'elles disparaissent spontanément au repos est très long (de l'ordre de plusieurs jours). Enfin, dans la région III, le taux de cisaillement est suffisamment important pour modifier l'ordre moléculaire. C'est la zone où le paramètre d'ordre augmente avec le cisaillement.

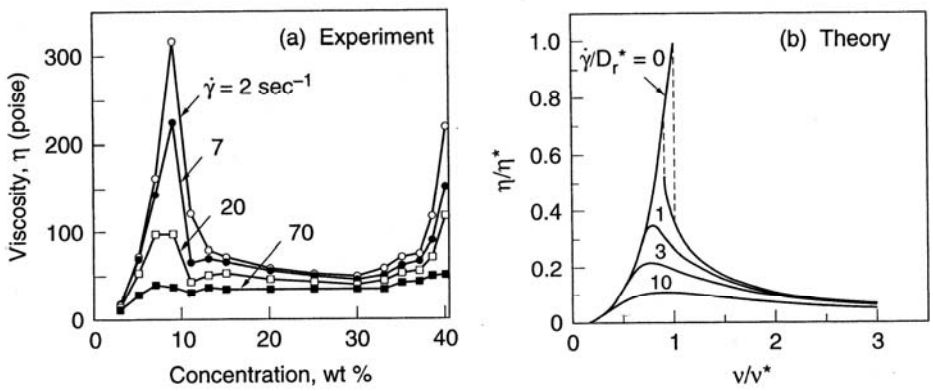


Figure 1 : Effet de la transition isotrope/nématique sur les propriétés rhéologiques (a) Viscosité mesurée du PBLG (M=238 kD) en fonction de sa concentration dans du *m*-crésol. La viscosité chute brutalement à la transition isotrope nématique qui a lieu à 10 wt% **(b)** Viscosité adimensionnelle en fonction de la concentration normalisée à différents taux de cisaillement réduits telle que prédite par la théorie de Doï. Tiré de Larson (1998).

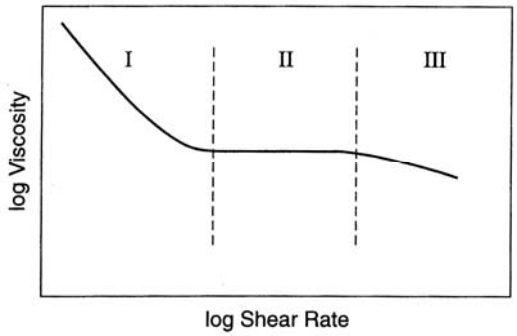


Figure 2 : Courbe d'écoulement théorique $\eta = f(\dot{\gamma})$ de Onogi et Asada pour les polymères cristaux liquides. Tiré de Larson (1998).

Enfin, notons que la chiralité moléculaire n'a souvent que peu d'effet sur les propriétés rhéologiques macroscopiques, sauf éventuellement dans la région I de la courbe d'écoulement (Figure 2), où le taux de cisaillement est suffisamment faible.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Observations visuelles

L'observation visuelle des solutions dans les piluliers et de leur réponse aux sollicitations d'une spatule constituent une première approche de leur comportement rhéologique (Figure 3). Nous en retirons principalement deux informations :

- Bien avant la transition isotrope/nématique (30-40 mg/ml), les solutions de collagène isotropes présentent de la biréfringence d'écoulement transitoire (Figure 3b), ce qui est le signe d'un alignement des molécules avec l'écoulement.
- Qualitativement, la transition sol/gel peut être mise en évidence par la présence de bulles d'air piégées à l'intérieur de l'échantillon lors d'une manipulation et par l'absence d'écoulement sur une échelle de plusieurs jours (Figure 3c). Néanmoins, il est possible d'éliminer ces bulles en centrifugeant les solutions denses (40-140 mg/ml) à 2000 × *g* pendant quelques minutes. Ceci est utile pour la suite car la présence de bulles peut très fortement perturber les mesures rhéologiques.

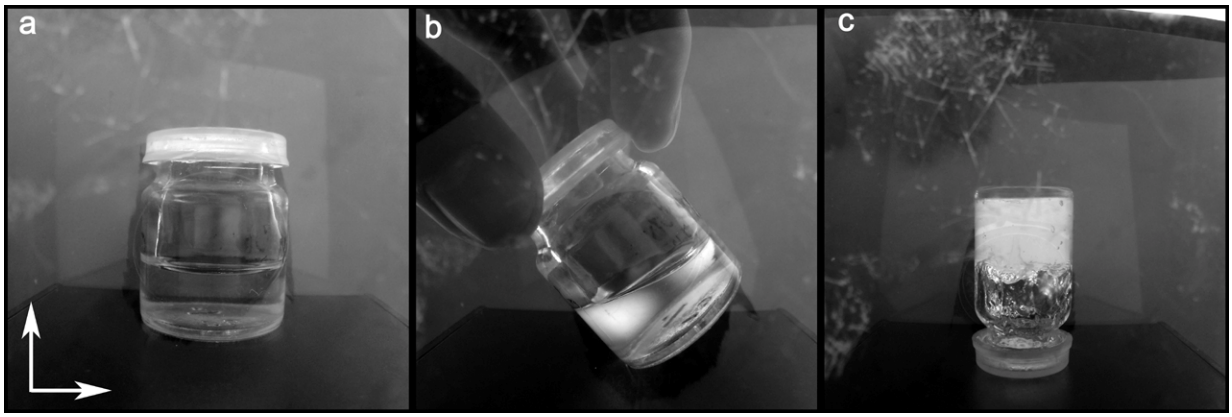


Figure 3 : Photographies de piluliers contenant des solutions de collagène placés entre polariseurs croisés. (a) Solution à 32 mg/ml, isotrope, au repos. **(b)** La même solution présente de la biréfringence d'écoulement. **(c)** « Solution » à 112 mg/ml. Biréfringente au repos, elle présente déjà l'aspect d'un gel physique.

3.2.2 Expériences en cellule de Couette

Lors des expériences de diffusion des rayons X à l'ESRF nous avons utilisé une cellule de Couette pour aligner les domaines nématiques de nos solutions concentrées de collagène (Cf. Chapitre 2, § 2.2.2). Dans le même temps, nous avons collecté quelques données rhéologiques qui, bien que préliminaires, nous ont permis de commencer à cadrer l'étude rhéologique de

solutions concentrées de collagène pour lesquelles il n'existe pratiquement aucune donnée dans la littérature.

Matériel – La cellule de Couette utilisée a déjà été décrite au chapitre précédent et par P. Panine *et al.*[9]. Il s'agit d'une cellule constituée de deux cylindres concentriques en polycarbonate. Le cylindre central (stator) reste immobile ; son diamètre extérieur est de 20 mm. Le cylindre extérieur (rotor), de diamètre intérieur 22 mm, tourne autour de façon contrôlée. L'épaisseur de l'entrefer mesure donc 2 mm et la cellule contient environ 2 ml de solution.

Nous avons imposé une rotation continue et fait varier le taux de cisaillement depuis 1 s^{-1} jusqu'à quelques centaines de s^{-1} quand les solutions le permettaient. Au-delà, les solutions les plus diluées sont expulsées de la cellule ; quant aux solutions concentrées (> 90 mg/ml), plus élastiques, elles développent des instabilités, voire se déchirent, dès 10-20 s^{-1}. La durée des expériences était de l'ordre de l'heure, au cours de laquelle l'évaporation du solvant est très négligeable. Enfin, la combinaison avec la diffusion des rayons X nous a permis de relier les changements rhéologiques avec la microstructure des échantillons. Par exemple, l'abaissement du stator dans le rotor provoque un cisaillement vertical des solutions nématiques, comme illustré par la Figure 4a.

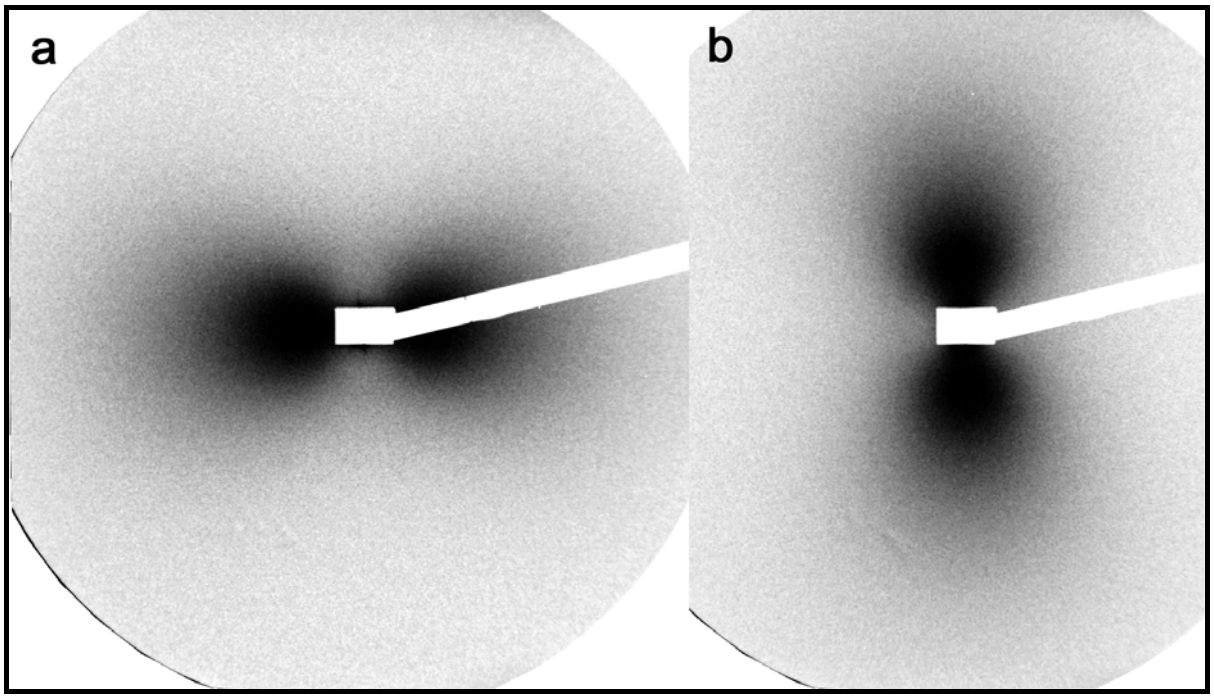


Figure 4 : Cliché de diffusion des rayons X d'une solution nématique de collagène (90 mg/ml) insérée dans une cellule de Couette. (a) Après l'abaissement du stator, la solution est cisaillée verticalement. (b) Après un faible cisaillement tangentiel ($\dot{\gamma}$ = 1 s^{-1}).

Rhéogrammes – Le tracé de la viscosité η en fonction du taux de cisaillement nous renseigne immédiatement sur le caractère rhéofluidifiant des solutions denses de collagène (Figure 5). Nous nous trouvons vraisemblablement dans la région III définie dans la Figure 2. Par ailleurs, nous voyons que la viscosité augmente fortement, pratiquement d'un facteur 30, avec la concentration entre 20 et 90 mg/ml.

Nous nous sommes aussi rendus compte de l'existence d'une contrainte seuil, sans avoir pu la mesurer. Cela signifie que les solutions denses ne s'écoulent qu'à partir d'une contrainte seuil σ_c. Le seuil d'écoulement correspond à la force nécessaire pour vaincre les forces de cohésion qui maintiennent une structure tridimensionnelle rigide dans le matériau au repos.

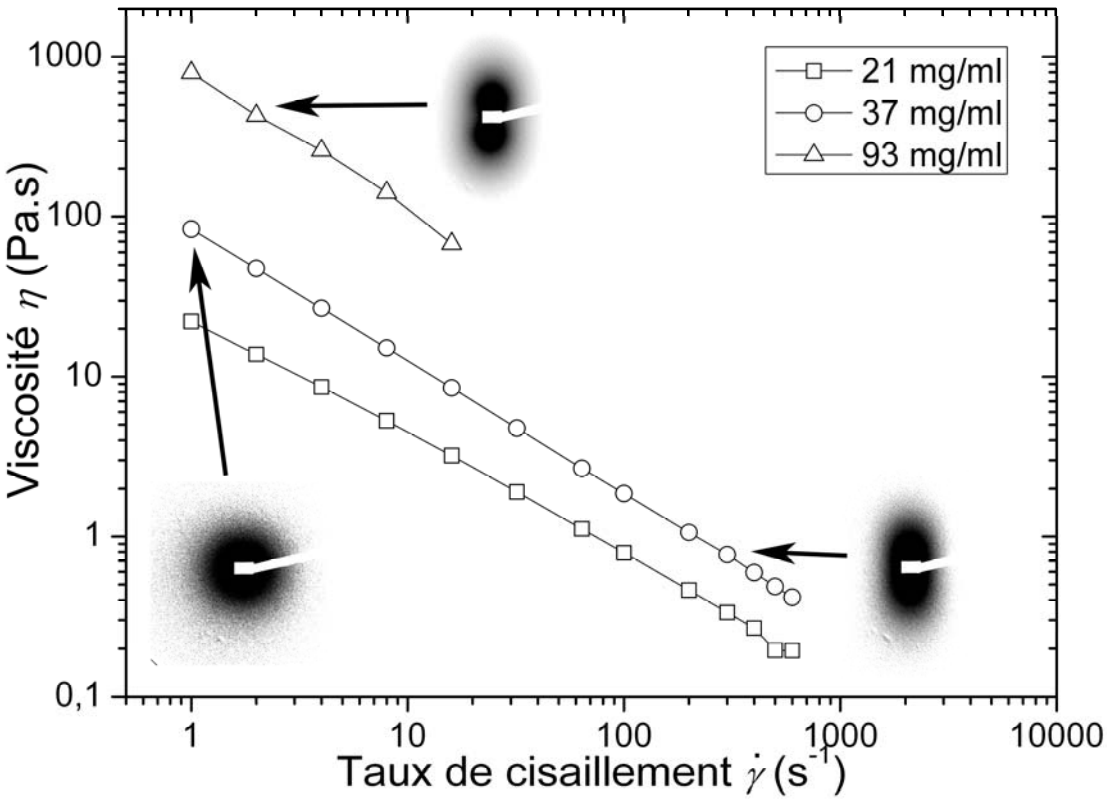


Figure 5 : Rhéogrammes de solutions acides de collagène (concentration par dialyse). Le comportement rhéofluidifiant est patent. Pour la solution à 93 mg/ml, les instabilités d'écoulement sont trop importantes au-delà d'un cisaillement de 16 s^{-1}. Les pentes sont respectivement égales à -0,72 (21 mg/ml), -0,83 (37 mg/ml) et -0,87 (93 mg/ml).

Influence de la force ionique – Nous avons pu constater qu'à concentrations égales, les solutions préparées par dialyse (concentration en acide acétique fixée à 500 mM) étaient systématiquement plus visqueuses que les solutions préparées par évaporation (de force ionique plus élevée, à cause de l'augmentation de la concentration de l'acide acétique – Cf. Chapitre 2). Nous avons rassemblé les données dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Effet de la force ionique sur la viscosité des solutions de collagène pour un cisaillement de 4 s^{-1}.

C (mg/ml)	*η (Pa.s) faible force ionique*	*$\varkappa^{-1}$ (nm)* dialyse*	*η (Pa.s) force ionique plus forte*	*$\varkappa^{-1}$ (nm)* évaporation*
~20	9	5,02	3	2,75
~36	28	4,64	20	2,16
~90	260	3,95	20	1,44

*Longueur de Debye calculée comme indiqué dans le chapitre 2 pour l'estimation des concentrations critiques.

Ce résultat confirme les observations visuelles que nous avions pu faire lors de la construction de la séquence de phases (Chapitre 2). L'augmentation de la force ionique a pour effet d'écranter les charges portées par les triples hélices et donc de réduire la portée des interactions répulsives entre les molécules, caractérisée dans le Tableau 1 par la longueur de Debye. La reptation des molécules les unes par rapport aux autres est donc facilitée, ce qui se traduit par une fluidification des solutions. Néanmoins, le manque de données nous interdit d'aller plus en avant dans l'interprétation.

Conclusion – En mettant à profit le montage expérimental nécessaire à l'étude de la structure des solutions par diffusion des rayons X, nous avons pu quantifier quelques observations visuelles : le caractère rhéofluidifiant des solutions et l'influence de la force ionique sur leur gélification. Cependant, ces mesures sont très lacunaires et ne permettent pas de distinguer la part du module visqueux de celle du module élastique. Par ailleurs cette étude en régime permanent n'est pas adaptée aux fluides trop enchevêtrés (et donc commençant à gélifier) car il conduit à de fortes instabilités d'écoulement et à la rupture du réseau moléculaire.
Il était donc nécessaire de poursuivre cette étude par des expériences en régime oscillant.

3.2.3 Géométrie cône-plan

La géométrie cône-plan permet de réaliser des expériences mieux contrôlées par rapport à celles réalisées en cellule de Couette. En effet, comme l'angle de la génératrice α du cône est inférieur à 5° (Figure 6), on peut considérer que la contrainte σ et la vitesse de déformation (ou taux de cisaillement) $\dot{\gamma}$ sont constantes en tout point de l'échantillon. Cette série d'expériences a été réalisée à l'Institut de Minéralogie et de Physique de la Matière Condensée en collaboration avec Sophie Asnacios sur un rhéomètre DSR500 (Rheometrics) à contrainte imposée.

Préliminaires – Pour choisir les conditions expérimentales, nous avons bénéficié du travail de maîtrise d'Hamid Lalmas[10]. Après avoir remarqué que l'acide acétique corrodait les éléments (cône et plan) en acier, ce dernier a vérifié les conditions de non glissement avec les éléments en verre que nous avons utilisés par la suite. Notons que les modules mesurés dans ces travaux préliminaires ne correspondent pas aux mesures présentées ici, les modules mesurés à 5 et 10 mg/ml étant systématiquement supérieurs d'un ordre de grandeur. Ceci peut éventuellement s'expliquer par le fait que le protocole employé était différent (il comprenait notamment une étape de sonication ; à ce sujet voir § 1.2.1). Par ailleurs, comme pour de nombreux fluides complexes, une totale reproductibilité est difficile à obtenir du fait de la réorganisation permanente des solutions sur des temps longs.

Les diamètres du cône et du plan étaient de 40 mm, l'angle du cône de 0,04 radians. La largeur de l'entrefer variait donc de 51 µm au centre à 800 µm au bord et le volume nécessaire pour remplir la cellule était d'environ 1 ml.

Afin de nous prémunir contre l'évaporation du solvant au cours de mesures qui peuvent être longues (de l'ordre de 24 heures), la cellule de cisaillement et l'échantillon sont placés dans une chambre environnementale saturée en acide acétique maintenue à 20°C. La température de l'échantillon était contrôlée par le biais d'un bain thermostaté alimentant la cellule.

Notons enfin que cet ensemble d'expériences a été réalisé uniquement avec des solutions concentrées par dialyse dans de l'acide acétique 500 mM à pH ~2,5.

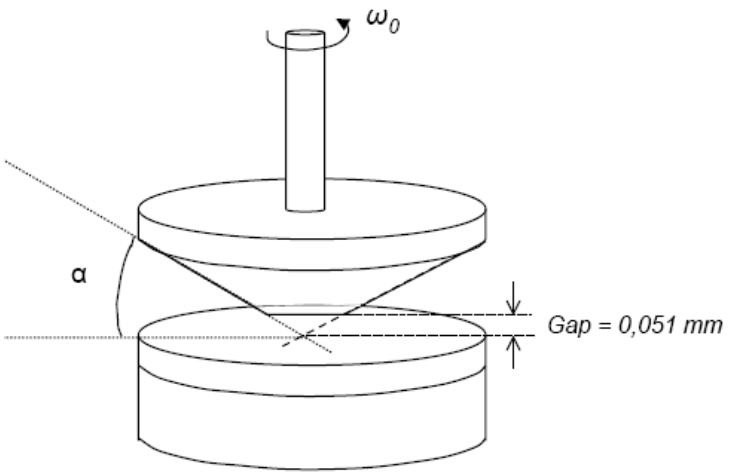


Figure 6 : Schéma d'une cellule de cisaillement en géométrie cône-plan (pas à l'échelle). Le cône est en réalité tronqué de façon à laisser un espace de 0,051 mm entre le rotor et le stator au niveau de l'axe de rotation. L'angle α de la génératrice est égal à 0,04 radian. (Dessin : H. Lalmas)

Protocole expérimental – La difficulté de l'étude des fluides complexes provient du fait que leurs propriétés rhéologiques dépendent de leur histoire. Ainsi, la structure des solutions peut être perturbée par des sollicitations trop grandes et mettre des temps très longs pour retrouver leur structure à l'équilibre. Ces durées de rééquilibration peuvent être nommées « mûrissement » ou « vieillissement ». Quoiqu'il en soit, il faut en tenir compte lors de la conception du protocole afin d'obtenir des résultats reproductibles et comparables, tout en limitant la durée des expériences, notamment pour éviter l'évaporation des solutions. Une autre difficulté provient de la large gamme de comportements couverte par les échantillons testés : les ordres de grandeur des modules mesurés s'étendent sur huit décades (Cf. Figure 10, Figure 11, Figure 12 et Figure 14). On comprend aisément qu'il est difficile d'appliquer exactement le même protocole à une solution newtonienne et à une solution quasi-élastique.

Nous nous sommes proposés de suivre le protocole suivant pour chaque échantillon, en adaptant si nécessaire les valeurs des contraintes imposées et des gammes de fréquences de sollicitation à chaque échantillon :

a) Resserrement de l'entrefer et précisaillement : comme le resserrement de l'entrefer provoque un cisaillement radial lors de l'écrasement de la solution à analyser, nous avons décidé de soumettre ensuite chaque échantillon à un cisaillement longitudinal initial en

régime permanent afin d'aligner les chaînes polymères tangentiellement à la rotation angulaire. Ce cisaillement était de l'ordre de 8 s^{-1} pendant 300 s[**].

b) Test en fluage (*Creep Test*) : Ce test permet d'estimer la viscosité complexe de la solution afin de pouvoir déterminer sur les abaques du constructeur la fréquence de sollicitation maximum accessible avec l'équipement utilisé.

c) Recherche du domaine linéaire (*Dynamic Strain/Stress Sweep Test*) (Figure 7) : ce test sert à déterminer la contrainte (ou la déformation) maximale applicable aux solutions, avant de rompre le réseau formé par les enchevêtrements. Ce test a été réalisé dans tous les cas à une fréquence de 1 $rad.s^{-1}$. Nous cherchons donc la gamme de contraintes dans laquelle les propriétés du réseau macromoléculaire ne changent pas.

d) « Vieillissement » (*Dynamic Time Sweep Test*) (Figure 8) : en recherchant les limites du domaine linéaire, nous avons déformé la structure des solutions. Avant de les caractériser, il nous faut donc attendre d'être dans un état de référence. Pour suivre l'évolution des modules *G*' et *G*", nous sollicitons les solutions à une fréquence de 1 $rad.s^{-1}$ pendant deux heures, avec la valeur de contrainte qui sera appliquée au test suivant.

e) Balayage en fréquences (*Dynamic Frequency Sweep Test*) (Figure 9) : Généralement, nous avons appliqué une contrainte correspondant à une déformation de 10% à une fréquence de sollicitation de 1 $rad.s^{-1}$ (voir valeurs dans le Tableau 2). La gamme de fréquences balayée est limitée dans les hautes fréquences par les caractéristiques techniques du rhéomètre et dans les basses fréquences par la viscoélasticité des solutions à caractériser.

f) Balayage en contraintes en régime permanent (*Steady Stress Sweep Test*) (Figure 14) : dans ce test nous soumettons l'échantillon à une rampe de contraintes croissantes en régime permanent (sans oscillation).

Tableau 2 : Paramètres imposés pour les tests en balayage en fréquences et en contraintes.

Concentration (mg/ml)	*Contrainte appliquée pour obtenir une déformation de ~10% à 1 rad.s^{-1} (Pa)*	*Domaine de fréquences balayé (rad.s^{-1})*	Rampe de contraintes (Pa)
4,9	0,1 (déformation « infinie »)	0,01-50	0,1-10
8,6	0,9	0,01-100	0,1-100
16,4	1,5	0,02-100	0,1-100
31	10	0,01-200	0,1-150
45	50	0,01-100	10-400
62	80	0,01-200	10-400
64	50	0,01-200	1-500
75	50	0,01-100	10-400
84	50	0,01-100	20-400
112	40	0,01-200	10-500
300	300 (~1% de déformation)	0,01-200	300-800*

*Les mesures obtenues ne sont pas exploitables.

[**] Rappel : pour ce taux de cisaillement dans une cellule de Couette, nous avions mesuré un paramètre d'ordre de 0,45 par diffusion des rayons X dans une solution nématique à 91 mg/ml.

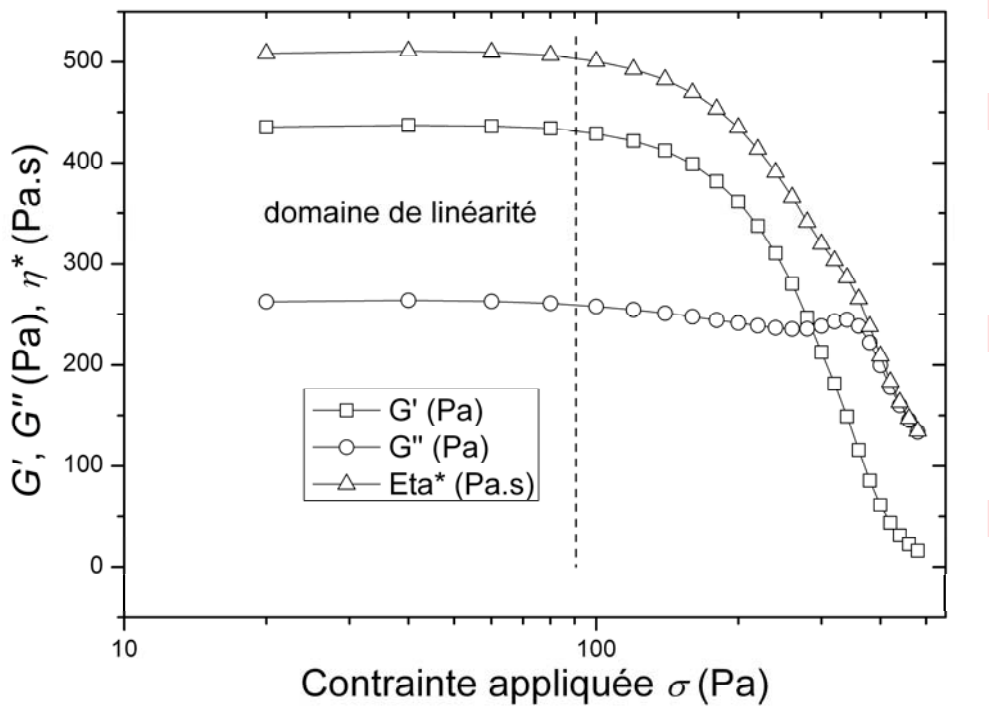


Figure 7 : Balayage en contraintes d'une solution à 84 mg/ml (test dynamique). Ce test permet de déterminer le domaine de linéarité. Au-delà de 100 Pa, le réseau formé par les enchevêtrements est détruit et la solution offre moins de résistance. Ici, du fait de l'existence d'une contrainte seuil, il était préférable d'imposer la contrainte plutôt que la déformation.

Les propriétés rhéologiques des fluides complexes dépendent souvent de leur histoire mécanique. Aussi, chaque étape du protocole a pour effet de modifier la structure des solutions et donc leurs propriétés d'écoulement. Tentons d'évaluer qualitativement les conséquences de chacun des tests effectués.

Précisaillements, test en fluage et recherche du domaine linéaire – Comme nous l'avons constaté avec la Figure 4, chaque contrainte mécanique a pour effet d'aligner de façon quasi définitive les échantillons nématiques (> 80-90 mg/ml). L'abaissement du cône sur la solution insérée dans la cellule conduit à aligner les chaînes polymères radialement. Pour corriger cet effet et réorienter les chaînes tangentiellement à la rotation du cône, nous avons choisi de soumettre les solutions à un précisaillement équivalent à ~8 s^{-1} pendant environ 300 s. Cette étape, de même que la recherche des limites du domaine linéaire, a certainement pour effet de perturber la structure des solutions puisqu'elles imposent de grandes déformations. Ainsi, le domaine linéaire que nous étudions n'est pas exactement celui des solutions à l'équilibre, mais de solutions revenant lentement à l'équilibre. C'est pour cela que nous attendons deux heures avant de réaliser le test en balayage de fréquences.

Pour les solutions isotropes jusqu'à 40 mg/ml, ces problèmes ne se présentent pas puisque nous avons vu dans nos expériences de diffusion des rayons X que l'effet du cisaillement sur leur structure relaxe en quelques secondes (Cf. Chapitre 2, Figure 11). À 2,5 mg/ml et en-dessous, les solutions sont trop diluées pour ce rhéomètre et les modules mesurés sont aberrants (valeurs négatives).

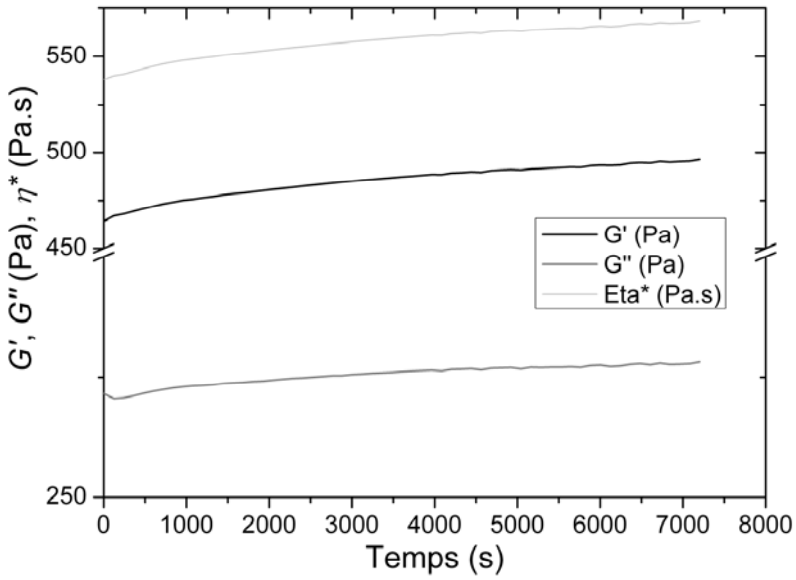


Figure 8 : Vieillissement d'une solution à 84 mg/ml sous une contrainte oscillante à $\omega = 1$ rad.s^{-1}.

Vieillissement en fonction du temps – Une fois que le cisaillement initial a cessé, les solutions denses reviennent doucement à l'équilibre. Les chaînes polymères se réenchevêtrent et rigidifient les solutions : la viscosité complexe η^* et les modules G' et G'' augmentent (Figure 8). En fait, les variations sont surtout sensibles pendant les premières minutes ; au-delà, un pseudoplateau est atteint. En pratique, nous avons attendu deux heures avant de commencer les balayages dynamiques en fréquence. Ainsi, nous avons pu nous affranchir d'une dérive potentielle au cours de l'acquisition des points et obtenir des courbes reproductibles, en balayant en ω croissants et décroissants. Nous avons estimé cette dérive à 0,05% de la différence $\Delta G'$ entre deux points successifs à $\omega = 1$ rad.s^{-1} sur la Figure 9.

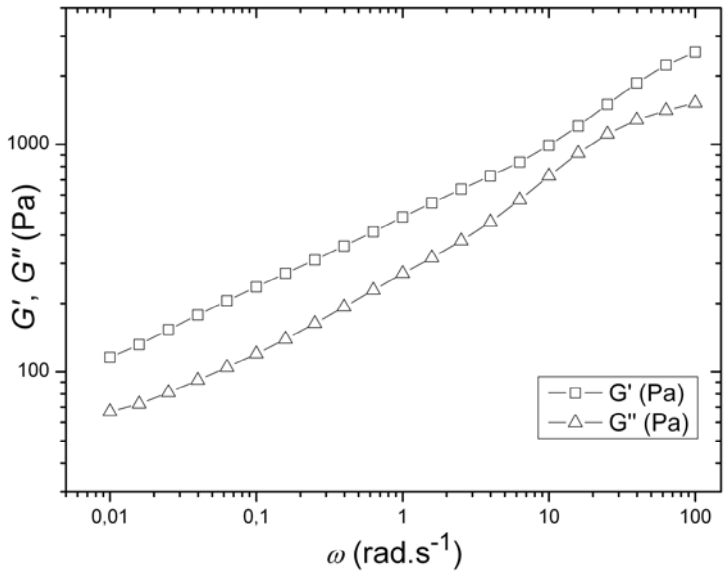


Figure 9 : Test dynamique en balayage de fréquences (84 mg/ml)

Balayage en fréquences – Les solutions de collagène ont un comportement viscoélastique dépendant de la fréquence de sollicitation (Figure 9). Les modules *G*' et *G*" augmentent avec la fréquence ; dans le domaine des basses fréquences, les courbes peuvent éventuellement être modélisées par des lois de puissance du type :

$$G' = A \times \omega^{a} \qquad \textbf{(11)}$$

$$G'' = B \times \omega^{\beta} \qquad \textbf{(12)}$$

Nous avons reporté les valeurs des coefficients *a* et *β* en fonction de la concentration des solutions dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Valeurs des indices de puissance α et β.

Concentration (mg/ml)	*a*	*β*
4,9	0,49	0,98
8,6	1,83	0,96
16,4	1,87	0,93
31	0,29	0,27
45	0,28	0,27
60	0,31	0,33
64	0,24	0,23
75	0,26	0,25
84	0,31	0,34
112	0,24	0,30
300	0,16	0,19

Entre 8,6 et 16,4 mg/ml, les indices mesurés concordent avec les indices théoriques prévus par les modèles de rhéologie de polymères fondus. Aux basses fréquences, le modèle de Rouse[11] pour les chaînes courtes et le modèle de reptation[12-14] pour les chaînes longues prévoient des indices

$a = 2$ et $\beta = 1$. À partir de 31 mg/ml, et jusqu'à 112 mg/ml, les indices a et β sont plutôt de l'ordre de $1/4$, voire éventuellement de $1/3$. La valeur de $1/4$ rappelle celle obtenue par Maggs[15] dans son modèle décrivant les solutions semi-diluées d'actine. Par ailleurs, le fait que les courbes de *G*' et de *G*" soient parallèles suggère que les mécanismes à l'origine de l'élasticité et de la viscosité sont les mêmes.

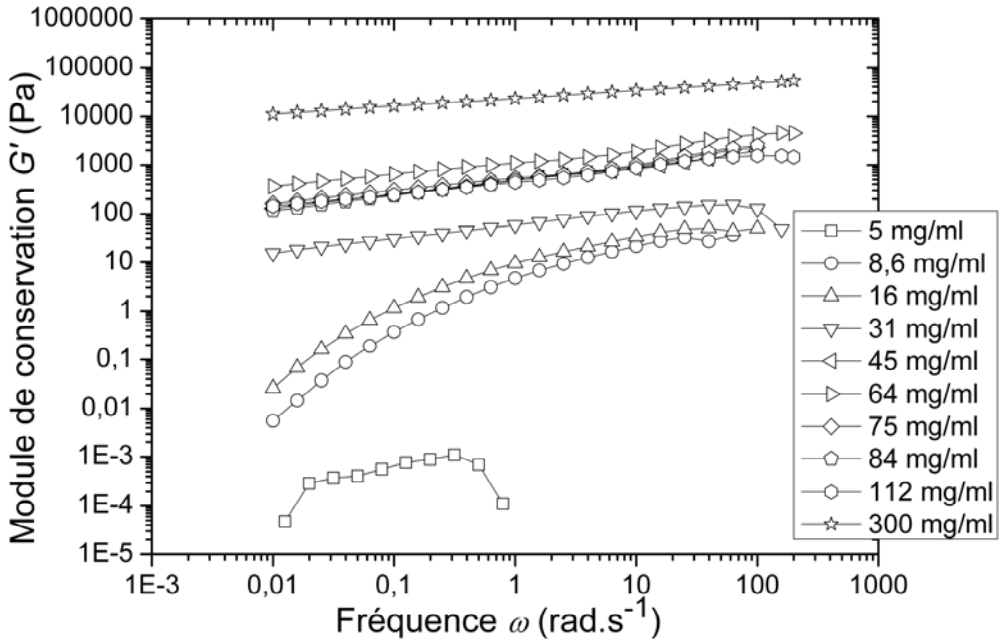


Figure 10 : Module de conservation *G'* en fonction de la fréquence de sollicitation *ω* pour différentes concentrations en collagène.

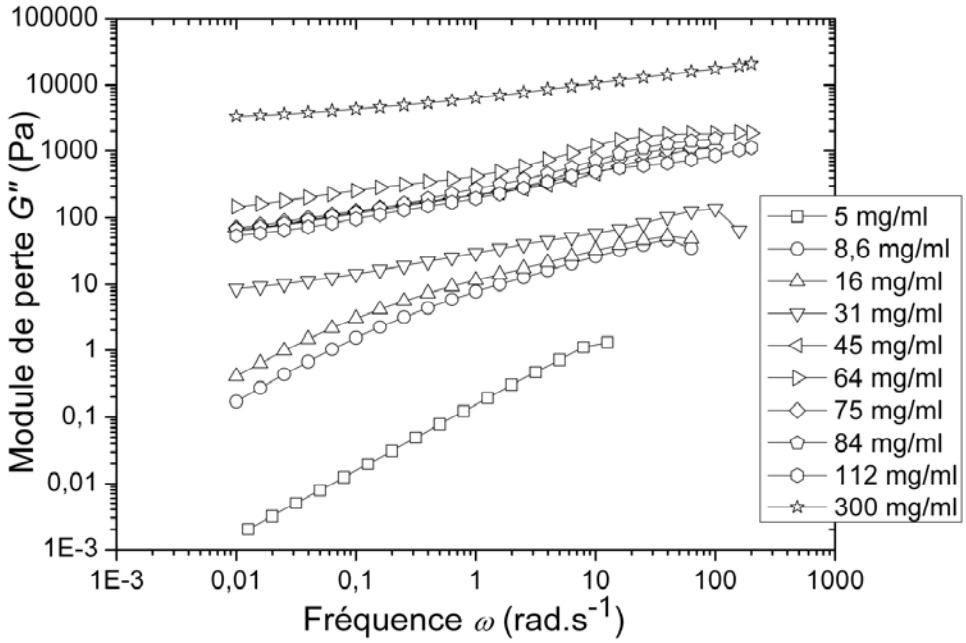


Figure 11 : Module de perte *G"* en fonction de la fréquence de sollicitation *ω* pour différentes concentrations en collagène.

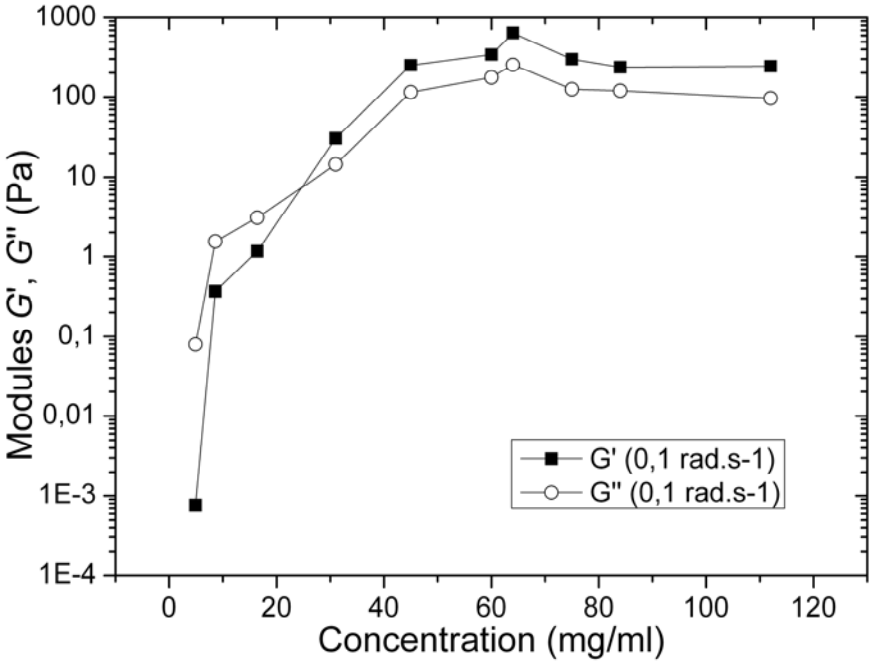


Figure 12 : Modules de perte *G"* et de conservation *G'* mesurés sous une sollicitation de fréquence 0,1 rad.s^{-1} en fonction de la concentration. Les valeurs de chacun des modules augmentent rapidement dans la phase isotrope avant d'atteindre un plateau peu avant la transition isotrope-nématique. À cette fréquence de sollicitation, la gélification a lieu entre 15 et 30 mg/ml.

Influence de la concentration – Le tracé des modules de perte *G"* et de conservation *G'* en fonction de la concentration représenté en Figure 12 résume les données rassemblées sur la Figure 10 et la Figure 11. Entre 5 et 30 mg/ml, les valeurs de chacun des modules augmentent très rapidement, ce qui correspond à une multiplication des enchevêtrements intermoléculaires dans une phase isotrope. À cette fréquence de sollicitation (0,1 rad.s^{-1}), *G"* > *G'* jusqu'à 15-30 mg/ml ; les solutions sont donc essentiellement visqueuses. Au-delà, *G"* < *G'*, ce qui signifie que l'élasticité domine. Il y a donc une transition sol/gel, que nous supposons physique bien que nous ignorions la nature exacte des liaisons intermoléculaires. Cette transition a lieu entre 15 et 30 mg/ml quelle que soit la fréquence de cisaillement dans l'intervalle 0,01-100 rad.s^{-1}. Cependant, il faut remarquer qu'il y a moins d'un ordre de grandeur de différence entre *G*' et *G*" après le croisement, et que cet écart reste à peu près constant. Il ne s'agit donc que d'une transition faible et les solutions restent essentiellement viscoélastiques.

Vers 45 mg/ml, les valeurs des modules atteignent un plateau. Dans certains systèmes nématogènes modèles comme le PBLG, un maximum de viscosité est observé juste avant la transition isotrope nématique (Cf. Figure 1). Les valeurs élevées obtenues à 64 mg/ml (Figure 12)

laissent penser que ce phénomène a aussi lieu dans les solutions de collagène ; néanmoins, cette affirmation nécessite d'être étayée par des mesures plus nombreuses aux environs de cette concentration. En l'absence de ces résultats complémentaires, nous nous contenterons de décrire la gamme de concentration [45-112 mg/ml] comme un plateau. La conservation de modules constants à concentrations croissantes est autorisée par l'alignement des molécules au sein de la phase nématique. Cet alignement a pour effet de faciliter la reptation des molécules.

La solution la plus concentrée caractérisée sur ce plateau est de 112 mg/ml. Nous n'avons pas eu l'occasion de caractériser des solutions dans l'intervalle de concentration [112 mg/ml-300mg/ml] et donc de déterminer la limite supérieure du plateau. À 300 mg/ml et ω = 0,1 rad.s^{-1}, nous avons mesuré G'' = 4338 Pa et G' = 16257 Pa, mais la « solution » n'était plus parfaitement homogène. Elle présentait des zones turbides dues à la présence d'agrégats. Ce type d'échantillon sera décrit et caractérisé plus en détails d'un point de vue structural dans le chapitre suivant (§ 4.3.3).

Expériences en régime permanent – Nous avons aussi réalisé des expériences en régime permanent afin de faire le lien avec les expériences en cellule de Couette présentées précédemment (§ 3.2.2). En l'occurrence, nous observons une très bonne correspondance entre les valeurs de viscosité mesurées indépendamment avec les deux géométries ; nous pouvons donc raisonnablement mettre en regard les données microstructurales obtenues par diffusion des rayons X et des mesures rhéologiques obtenues en géométrie cône-plan.

Les courbes présentées dans la Figure 13 confirment que le collagène est fortement rhéofluidifiant dès que la concentration est supérieure à 5-10 mg/ml. Ce comportement rhéofluidifiant peut s'interpréter comme la rupture du réseau de molécules enchevêtrées dans les solutions de collagène ou simplement comme l'alignement des molécules. En particulier, nous avions constaté une augmentation du paramètre d'ordre, donc de l'alignement, dans les solutions isotropes en fonction du taux de cisaillement (Chapitre 2, Figure 17). Sur certains graphes, nous observons l'existence d'un palier de viscosité correspondant vraisemblablement à la région II du modèle d'Onogi et Asada. Le domaine que nous explorons le plus largement serait donc la région III.

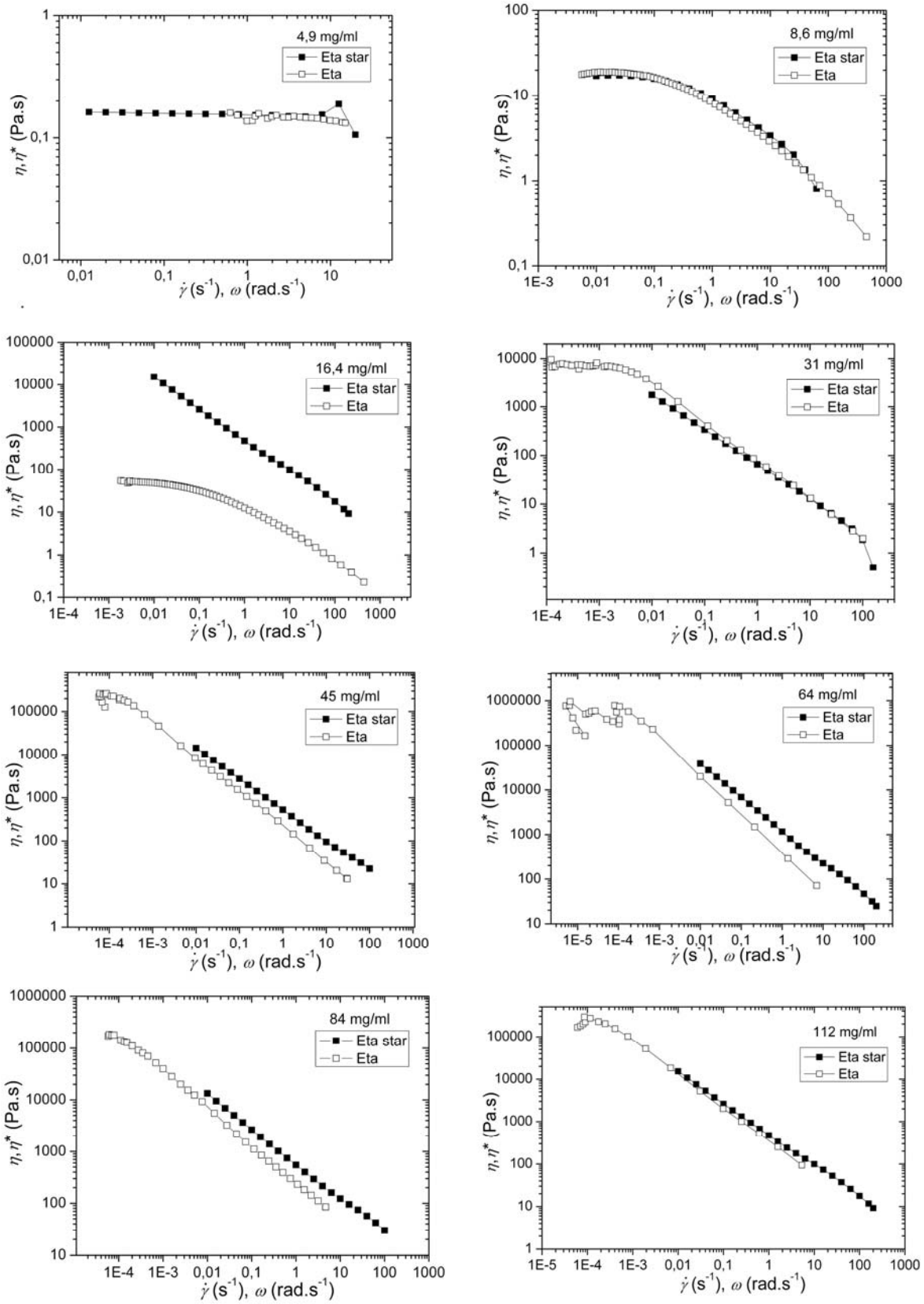


Figure 13 : Comparaison de la viscosité complexe (ou dynamique) η^* mesurée en régime oscillant et la viscosité apparente η mesurée en régime continu pour différentes concentrations. Le comportement rhéofluidifiant du collagène en solution dense est ici mis en évidence ; en revanche, la loi de Cox-Merz n'est pas exactement vérifiée.

Application de la loi de superposition de Cox-Merz[16] – Il s'agit d'une loi de corrélation empirique proposée par Cox et Merz, qui s'applique *a priori* à des solutions polymères simples, où les viscosités apparente et complexe se superposent sur le même graphe, à savoir :

$$\eta^*(\omega) = \eta_a(\dot{\gamma})\big|_{\omega=\dot{\gamma}} \qquad \textbf{(13)}$$

Cette loi égalise la viscosité complexe η^* mesurée en régime dynamique oscillant et la viscosité apparente η_a mesurée en régime permanent, où l'on prend ω en lieu et place de $\dot{\gamma}$. Quand cette loi est suivie par le système étudié, elle peut être utilisée pour prédire les propriétés en régime permanent à partir de mesures en régime dynamique oscillant sans en altérer la structure. Elle est généralement valide pour les macromolécules flexibles.

Sur la Figure 13, nous constatons que cette loi empirique ne s'applique pas parfaitement à notre système. Dans notre cas, la viscosité complexe η^* est de façon générale plus élevée que la viscosité apparente η_a, mais les tendances sont très semblables.

Par ailleurs, nous avons essayé de modéliser la partie linéaire des courbes expérimentales de la Figure 13 par des lois de puissances comme proposé par Ostwald[17,18] :

$$\eta \propto K\dot{\gamma}^{-n} \qquad \textbf{(14)}$$

Où K est une constante et n est un exposant à déterminer dont la valeur traduit l'écart avec le comportement newtonien pour lequel $n = 0$. Nous avons reporté ces exposants en fonction de la concentration des solutions dans le Tableau 4 ci-dessous. L'exposant n_1 a été mesuré en régime permanent ($\eta = f(\dot{\gamma})$) et n_2 en régime oscillant ($\eta^* = f(\omega)$).

Tableau 4 : Valeur des exposants n_1 et n_2 en fonction de la concentration en collagène.

Concentration (mg/ml)	n_1 (η_a)	n_2 (η^*)
4,9	0,09	0,012
8,6	0,67	0,46‡
16,4	0,65-0,72	0,67‡
31	0,79	0,75
45	0,81	0,71
62*	0,78*	0,64-0,68*
64	0,81	0,73
75	0,87	0,71
84	0,73	0,66
112	0,79	0,73
300	–	0,84

‡ Domaine de linéarité restreint.

Les valeurs obtenues à partir de 31 mg/ml se comparent bien avec celles obtenues avec du xanthane[19] et du polystyrène[20] et à la valeur limite maximale de 0,818 prévue par la théorie de Graessley pour des polymères flexibles monodisperses, sachant que la polydispersité des longueurs de chaînes est censée réduire la valeur absolue de n.

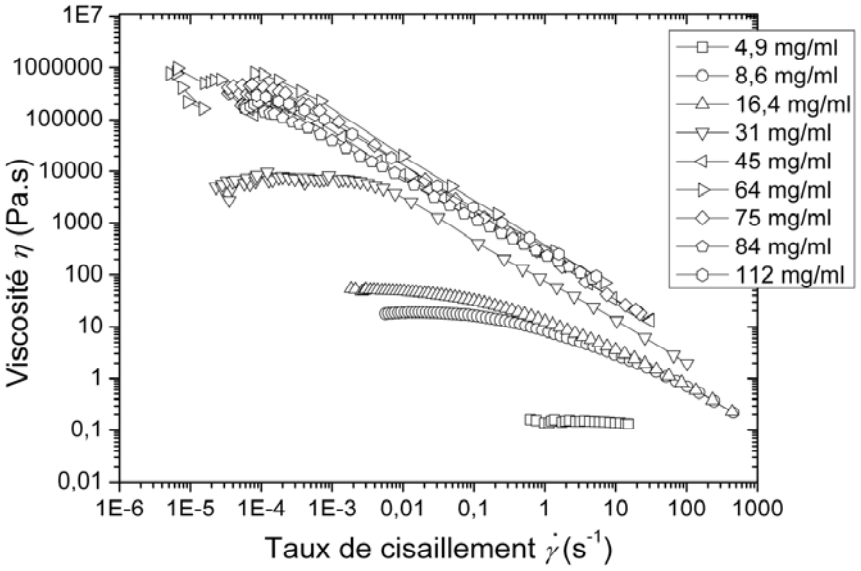


Figure 14 : Balayage en taux de cisaillement (contrainte imposée) pour différentes concentrations en collagène. La partie linéaire des courbes peut être modélisée par une loi de puissance du type $\eta = K\dot{\gamma}^n$, avec $-n \sim 0{,}70\text{-}0{,}84$.

Sur la Figure 14, nous avons rassemblé les courbes de balayage en taux de cisaillement pour différentes concentrations déjà présentées séparément dans la Figure 13. Mise à part la solution à 4,9 mg/ml qui présente encore un comportement newtonien, toutes les solutions ont un comportement rhéofluidifiant à partir d'un taux de cisaillement critique $\dot{\gamma}_C$, qui correspond au début du domaine linéaire dont est tiré l'indice n_1. L'inverse de cette valeur définit un temps caractéristique τ_C en dessous duquel les chaînes n'ont pas le temps de se réenchevêtrer. Les temps caractéristiques pour différentes concentrations sont reportés dans la Figure 15. Ils sont de l'ordre de la minute pour les solutions de 20-40 mg/ml jusqu'à l'heure pour les solutions de plus de 60 mg/ml. Un plateau semble alors être atteint, ce qui peut s'interpréter par le fait que la phase à l'équilibre est la phase anisotrope ; les molécules restent donc globalement alignées quelle que soit la concentration entre 50 et 120 mg/ml.

Par ailleurs, la Figure 16 illustre une nouvelle fois le phénomène de fluidification qui apparaît peu avant la transition isotrope/nématique.

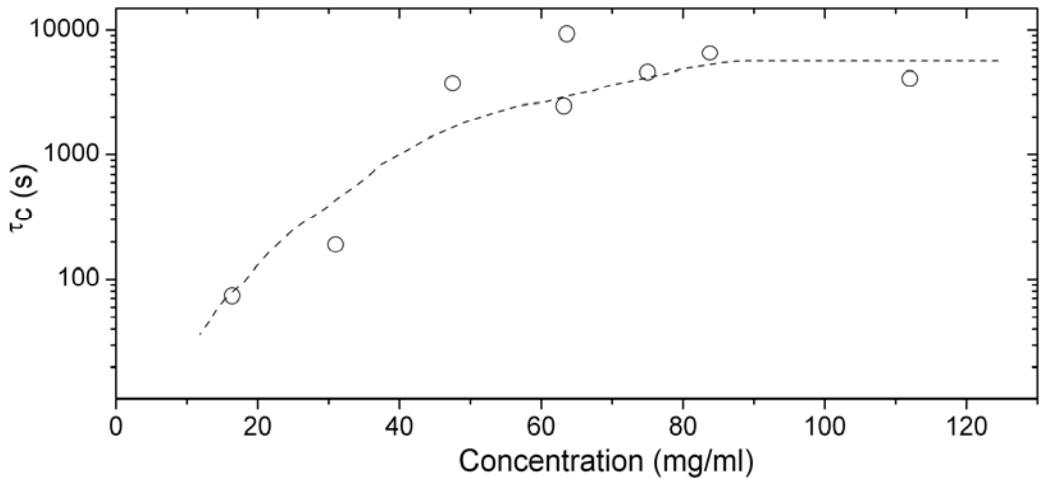


Figure 15 : Temps caractéristiques de désenchevêtrement en fonction de la concentration des solutions. Ces temps sont définis comme $\tau_C = 1/\dot{\gamma}_C$, où $\dot{\gamma}_C$ est le taux de cisaillement à partir duquel la relation $\eta = f(\dot{\gamma})$ suit une loi de puissance (linéaire en échelle log, voir Figure 13).

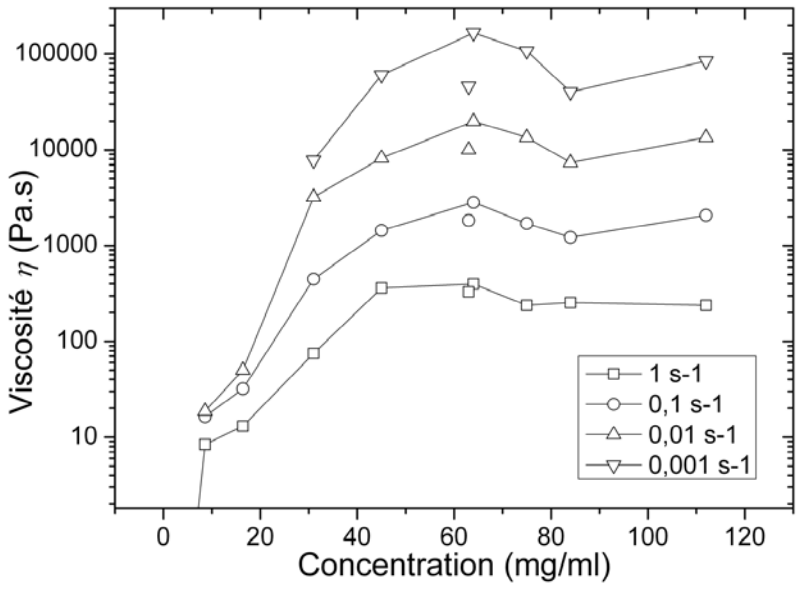


Figure 16 : Viscosité η mesurée à différents taux de cisaillement en fonction de la concentration. La question de savoir si il existe un plateau ou un maximum avant la transition isotrope/nématique reste entière…

Influence de la température – Dans la mesure où le solvant aqueux de nos solutions gèle à 0°C et que le collagène menace de se dégrader - au moins partiellement - à partir de 30°C, la gamme disponible pour étudier l'influence de la température sur le comportement rhéologique des solutions de collagène est très limitée là où certains modèles nécessitent des données sur plusieurs décades. Néanmoins, nous avons réalisé la même série d'expériences sur un échantillon concentré représentatif (84 mg/ml) à trois températures (4, 13 et 20°C) sans discerner de différence de comportement notable. Il est vrai que pour des concentrations plus diluées (5-10 mg/ml), l'influence de la température peut être plus sensible. Classiquement, on s'attend à ce que la viscosité diminue quand la température augmente, ce qui avait effectivement été constaté par H. Lalmas à 5 et 10 mg/ml.

3.3 Conclusion

Le collagène, un fluide complexe – Les solutions denses de collagène ne peuvent être caractérisées par un seul paramètre rhéologique ni par un seul type d'expérience. Nous avons trouvé certaines similitudes avec le comportement de certains polymères cristaux-liquides thermotropes nématiques tels qu'étudiés par Romo-Uribe[21] : G' > G", $\eta^* > \eta_a$. Par ailleurs, alors que la viscoélasticité augmente de façon importante avec la concentration dans la phase isotrope, nous avons constaté un effet fluidifiant de la phase nématique, dont l'ampleur reste à déterminer. En effet, les résultats présentés ici ne permettent pas de discerner s'il existe un maximum de viscosité prétransitionnel ou s'il s'agit d'un simple plateau.

Organisation cholestérique et gélification – Dans ce chapitre, nous avons vu que les solutions denses de collagène deviennent plus élastiques que visqueuses peu avant la transition isotrope/nématique, sans pour autant gélifier complètement, puisque le module visqueux reste proportionnellement important par rapport au module élastique. Cette gélification partielle est probablement due à la multiplication des interactions entre les triples hélices en solution. Cependant, nous ignorons encore la nature exacte de ces liaisons physiques. Il pourrait s'agir de simples enchevêtrements mécaniques, dans lesquels les chaînes polymères « s'entremêleraient », mais aussi d'interactions électrostatiques ou hydrophobes de nature attractive entre certaines séquences de résidus. À cet égard, il est très possible que les conditions de solvant ne soient pas idéales, dans le sens où, à 500 mM d'acide acétique, les répulsions électrostatiques sont partiellement écrantées. Dans cette perspective, il serait peut-être intéressant de trouver un solvant permettant d'obtenir des phases cristal liquides plus fluides.

En réalité, la gêne de la mise en ordre cristal-liquide par la gélification est courante dans les systèmes lyotropes, notamment chez les argiles[22] ou par exemple dans le cas de l'actine[23,24]. Dans notre cas, la gélification est vraisemblablement plus due à des enchevêtrements qu'à des interactions de type attractif[25]. Cependant, elle n'est pas suffisante pour empêcher la transition isotrope/nématique puisque nous avons vu dans le chapitre précédent que les solutions denses de collagène présentent les propriétés d'une phase nématique. En effet, nous aurions pu craindre que la biréfringence observée ne provienne que du blocage cinétique d'un écoulement. Or nous avons vu i) que des solutions isotropes concentrée par évaporation sans perturbation devenaient biréfringentes ii) les textures se modifiaient en quelques jours sans que la biréfringence ne disparaisse pour autant (Chapitre 2, §3.2.1) ; les mouvements moléculaires ne sont donc pas totalement gelés sur cette échelle de temps. Par ailleurs, contrairement à certains systèmes[26,27], les suspensions de collagène ne sont pas sensibles au champ gravitationnel et nous n'observons pas de sédimentation ni de floculation.

*

Une autre question que nous laisserons en suspens jusqu'au chapitre suivant est celle relative à l'influence des propriétés viscoélastiques des solutions acides sur la fibrillogenèse. En particulier, nous pressentons que les temps caractéristiques de réenchevêtrement – et donc la mobilité des molécules – puissent être corrélés avec la cinétique de formation des fibrilles et avec leur taille finale.

Références du Chapitre 3

[1] Cabane B. et Hénon S. "Liquides – Solutions, dispersions, émulsions, gels" Ed. Belin (Paris), Collection Echelles (2003)

[2] Newman S., Cloître M., Allain C., Forgacs G. et Beyens D. "Viscosity and Elasticity During Collagen Assembly In Vitro: Relevance to Matrix-Driven Translocation" *Biopolymers* **41** (1997) 337-347

[3] Forgacs G., Newman S.A., Hinner B., Maier C.W., Sackmann E. "Assembly of Collagen Matrices as a Phase Transition Revealed by Structural and Rheological Studies" *Biophys. J.* **84** (2003) 1272-1280

[4] Newman S.A.; Forgacs G., Hinner B., Maier C.W., Sackmann E. "Phase Transformation in a Model Mesenchymal Tissue" *Physical Biology* **1** (2004) 100-109

[5] Djabourov M., Lechaire J.-P., Gaill F. "Structure and Rheology of Gelatin and Collagen Gels" *Biorheology* **30** (1993) 191-205

[6] Hsu S., Jamieson A.M., Blackwell J. "Viscoelastic Studies of Extracellular Matrix Interactions in a Model Native Collagen Gel System" *Biorheology* **31**:1 (1994) 21-36

[7] Zhu W., Iatridis J.C., Hlibczuk V., Ratcliffe A., Mow V.C. "Determination of Collagen-Proteoglycan Interaction In Vitro" *J. Biomechanics* **29**:6 (1996) 773-783

[8] Larson R.G. "The Structure and Rheology of Complex Fluids", Oxford University Press, New York (1998) p. 508-550

[9] Panine P., Gradzielski et Narayanan T. "Combined Rheometry and Small-Angle X-ray Scattering" *Rev. Sci. Instrum.* **74**:4 (2003) 2451-2455

[10] Lalmas H. "Auto-assemblage de Collagène de type I – Caractéristiques Rhéophysiques" Mémoire de stage de Maîtrise de Chimie Physique, Université Pierre et Marie Curie (2004)

[11] Rouse P.E. "A Theory of the Linear Viscoelastic Properties of Dilute Solutions of Coiling Polymers" *J. Chem. Phys.* **21**:7 (1953) 1272-1280

[12] De Gennes P.G. "Reptation of Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles" *J. Chem. Phys.* **55**:2 (1971) 572-579

[13] Doï S. et Edwards S.F. "Dynamic of Concentrated Polymer Systems" J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 **74** (1978) 1802-1817

[14] Doï S. et Edwards S.F. "The Theory of Polymer Dynamics" Oxford University Press (1986)

[15] Maggs A.C. "Two Plateau Moduli for Actin Gels" *Phys. Rev. E* 55:6 (1997) 7396-7400

[16] Cox W.P. et Merz E.H. "Correlation of Dynamic and Steady Viscosities" *J. Polym. Sci.* **28** (1958) 619-622

[17] Ostwald W. "Über die Geschwindigkeitsfunktion in der Viskosität disperser Systeme-117" *Kolloid Zeitschrift* **36** (1925) 99

[18] Couarraze G. et Grossiord J.L., « Initiation à la Rhéologie », 2ème édition, Ed. Tec&Doc (Paris) (1991)

[19] Milas M., Rinaudo M., Knipper M., Schuppiser J.-L. "Flow and Viscoelastic Properties of Xanthan Gum Solutions" *Macromolecules* **23** (1990) 2506-2511

[20] Graessley W.W. "The Entanglement Concept in Polymer Melts" *Adv. Polym. Sci.* **16** (1974) 1

[21] Romo-Uribe A. "On the Molecular Orientation and Viscoelastic Behaviour of Liquid Crystalline Polymers: the Influence of Macromolecular Architecture" *Proc. R. Soc. Lond. A* **457** (2001) 207-229

[22] Gabriel J.C.P., Sanchez C., Davidson P. "Observation of Nematic Liquid-Crystal Textures in Aqueous Gels of Smectite Clays" *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 11139-11143

[23] Helfer H., Panine P., Carlier M.-F., Davidson P. "The Interplay between Viscoeleastic and Thermodynamic Properties Determines the Birefringence of F-Actin Gels" *Biophys. J.* **89** (2005) 543-553

[24] Viamontes, J. Oakes P.W., Tang J.X. "Isotropic to Nematic Liquid Crystalline Phase Transition of F-Actin Varies from Continuous to First Order" *Phys. Rev. Lett.* **97** (2006) 118103

[25] Pelletier O., Davidson P., Bourgaux C., Livage J. "The Effects of Attractive Interactions on the Nematic Order of V2O5 Gels" *Europhysics Letters* **48**:1 (1999) 53-59

[26] Zhang J., Luan L., Zhu W. Liu S., Sun D. "Phase Behavior of Aqueous Suspensions of Mg_2Al Layered Double Hydroxide: The Competition among Nematic Ordering, Sedimentation, and Gelation" *Langmuir* **23** 10 (2007) 5331-5337

[27] Van der Beek D. et Lekkerkerker H.N.W. "Nematic Ordering vs. Gelation in Suspensions of Charged Platelets" *Europhys. Lett.* **62**:5 (2003) 702-707

Chapitre 4

La fibrillogenèse *in vitro* en milieu dense

But do not underestimate the shallowness of my understanding.
For instance, I chose 37 degrees Fahrenheit for an equilibrium point
because 37 degrees Celcius is the temperature of the human body.
Cute, huh?
- Thomas Pynchon[*]

Comme nous l'avons vu précédemment, les solutions de collagène sont stables à pH acide, à basses température (< 25°C) et force ionique (< 600 mM). Mais dès que le pH, la force ionique et/ou la température sont relevés, les molécules de collagène peuvent s'assembler spontanément en fibrilles organisées et les solutions deviennent des gels percolants. Ce phénomène a été largement étudié *in vitro* en milieu dilué depuis les années 60 et, plus récemment, dans l'équipe à partir de solutions cholestériques[1,2]. Nous nous sommes, pour notre part, attachés à caractériser les gels denses et ordonnés formés à partir des solutions concentrées étudiées aux chapitres précédents à l'aide d'observations optiques, de la diffusion des rayons X et de la microscopie électronique. Outre l'influence de la concentration, nous avons étudié l'influence du pH et de la force ionique sur la structure des gels formés.

[*] Introduction à "Slow Learner" (Back Bay Books, 1984)

4.1 Les fibrilles de collagène/rappels bibliographiques

Les fibrilles de collagène définissent la forme des tissus vivants et sont à l'origine de leur stabilité thermique[3,4] et de leur résistance mécanique[5]. Elles peuvent atteindre plusieurs millimètres de long et leur diamètre peut varier de quelques nanomètres à un demi micron suivant le tissu considéré et leur stade de développement. Les fibrilles sont arrangées dans les tissus en une diversité d'architectures tridimensionnelles spécifiques ; par exemple, dans les tendons et les ligaments elles sont assemblées en faisceaux parallèles ondulés, dans la cornée en un contreplaqué orthogonal et dans l'os compact en lamelles concentriques constituant les ostéones.

4.1.1 Structure des fibrilles de collagène

Nous avons décrit dans le chapitre 1 la structure de la molécule de collagène de type I. Dans des conditions physiologiques, les triples hélices de collagène forment spontanément, au cours d'un processus nommé fibrillogenèse, des édifices supramoléculaires organisés de façon très précise, les fibrilles. Ces édifices sont initialement stabilisés par des interactions polaires, hydrophobes et non covalentes. Plus tard, ils peuvent être renforcés par des réticulations covalentes (*cross-links)*. Il est probable que le domaine hélicoïdal de la molécule renferme toute l'information nécessaire pour l'organisation intermoléculaire, tandis que les télopeptides jouent un rôle plus spécifique dans la catalyse du processus et dans la formation des réticulations.

Il faut noter au passage que seule une partie des collagènes est à même de former des fibrilles (types I, II, V et XI), tandis que les autres forment des réseaux (types IV, VIII et X), existent en tant que protéines transmembranaires (type XIII et XVII) ou s'associent à la surface des fibrilles (types IX, XII et XIV)[6,7]. En effet, la plupart des fibrilles rencontrées *in vivo* sont hétérotypiques, dans le sens où elles sont constituées de différents types de collagènes. Par exemple, les fibrilles de collagène dans la peau sont faites de molécules de types I, III et V et celles du cartilage des types II et XI. Néanmoins, la plupart des études sur la structure des fibrilles de collagène ont été réalisées à l'aide de tendons de queues de rat ou de kangourou[8] qui contiennent à environ 90% en masse (poids sec) du collagène de type I. De même, des solutions plus ou moins purifiées de collagène I servent généralement de matière première aux expériences de fibrillogenèse *in vitro*.

Les modèles de structure des fibrilles de collagène ont principalement été proposés à partir de clichés de diffraction de rayons X[9] et d'observations en microscopie électronique[10]. La diffraction des rayons X par des tendons donne lieu à un signal équatorial reflétant l'organisation

latérale des molécules dans la fibrille (interdistance *d*) et à un signal méridional reflétant l'organisation axiale des molécules (interdistance *D*) doté de nombreuses harmoniques.

Organisation axiale des triples hélices dans les fibrilles – La plus remarquable caractéristique structurale des fibrilles de collagène est le décalage axial des molécules les composant par des valeurs multiples de *D*. La période *D* est classiquement donnée pour ~67 nm[†] et correspond à 234±1 acides aminés, déterminés par analyse de séquence. Comme la longueur des molécules correspond à 4,47 *D*, soit une valeur non-entière, il faut un espace vide (*gap*) résiduel entre deux molécules alignées. Il existe donc des régions distinctes plus ou moins denses, respectivement les *overlaps* (zones de recouvrement de 20 nm de long) et les *gaps* (zones vides de 47 nm de long), régulièrement réparties le long des fibrilles. (Figure 1). Ce modèle a été proposé par Hodge et Petruska en 1963 et précisé par la suite par Miller au niveau des acides aminés. Néanmoins, bien que très explicite à deux dimensions, ce modèle est plus délicat à étendre à la troisième dimension dans l'épaisseur de la fibrille.

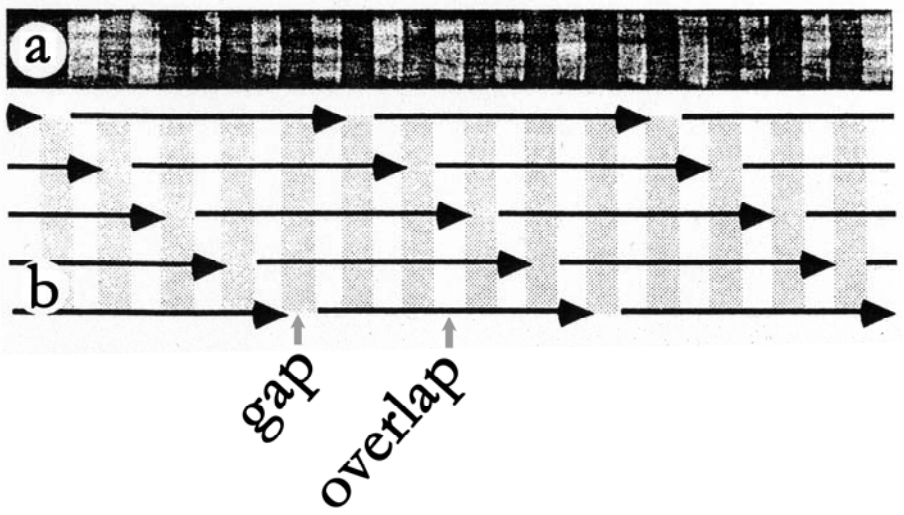


Figure 1 : (a) Micrographie électronique d'une fibrille de collagène en coloration négative. La fibrille présente une striation caractéristique de période *D*~67 nm due à la présence de contrastant dans les zones vides (*gaps*) **(b)** Modèle à deux dimensions de Hodge et Petruska. Le motif périodique provient du décalage axial périodique des triples hélices de longueur 4,47*D*. Tiré et adapté de Parry (1988).

Ce décalage périodique est une conséquence directe de la structure primaire du collagène (Chapitre 1 § 1.1.3). En effet, quand deux triples hélices sont adjacentes, les chaînes latérales des acides aminés les composant sont suffisamment proches pour donner lieu à des interactions faibles de type électrostatique entre résidus chargés et de type hydrophobe entre résidus non

[†] En fait cette valeur peut varier entre 64 et 68 nm suivant les tissus et le taux d'hydratation des fibrilles étudiés.

chargés. Ainsi, Hulmes *et coll.*[11] ont montré que les maxima d'interaction coïncident avec les décalages de périodes n*D* (Cf. Figure 2). Enfin, ce décalage permet de former des réticulations dans les zones de recouvrement. Ainsi, le décalage périodique axial des triples hélices confère aux fibrilles de collagène une bonne résistance mécanique à la tension.

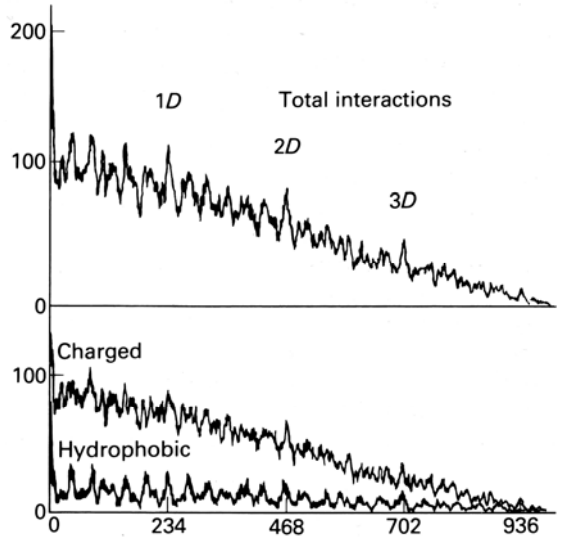


Figure 2 : Simulation des interactions hydrophobe et électrostatique entre deux molécules de collagène adjacentes. L'abscisse correspond au décalage entre les deux séquences polypeptidiques en nombre d'acides aminés. Les maxima d'interaction correspondent aux périodes *D* de 67 nm (soit 234 résidus). Tiré de Hulmes *et al.* (1973)

En microscopie électronique à transmission, ce décalage périodique donne lieu à une alternance caractéristique de bandes claires et de bandes sombres (ou « striations ») quand l'échantillon a été traité en coloration négative[12], du fait de la concentration en éléments lourds dans les *gaps*. Ces striations caractéristiques sont aussi observables en microscopie électronique à balayage et en microscopie de force atomique[13- 17]. Cette dernière observation montre que ce décalage périodique se traduit effectivement par des reliefs topologiques. Très récemment, Bozec *et al.*[18] ont proposé une structure « en corde » d'après des études en microscopie de force atomique (AFM), remettant en question le modèle pourtant largement accepté de Hodge et Petruska.

En coloration positive, le motif dessiné par les striations est bien différent car le contrastant va se fixer spécifiquement sur certains résidus. De cette façon on arrive à « cartographier » la séquence d'acides aminés. Toutefois, du fait de la taille des particules de contrastant, la résolution n'est pas à l'échelle de l'acide aminé mais d'un groupe d'acides aminés.

La diffusion des rayons X par des fibrilles de collagène donne lieu à un cliché caractéristique composé de nombreuses harmoniques de la période fondamentale de ~67 nm (Figure 3a).

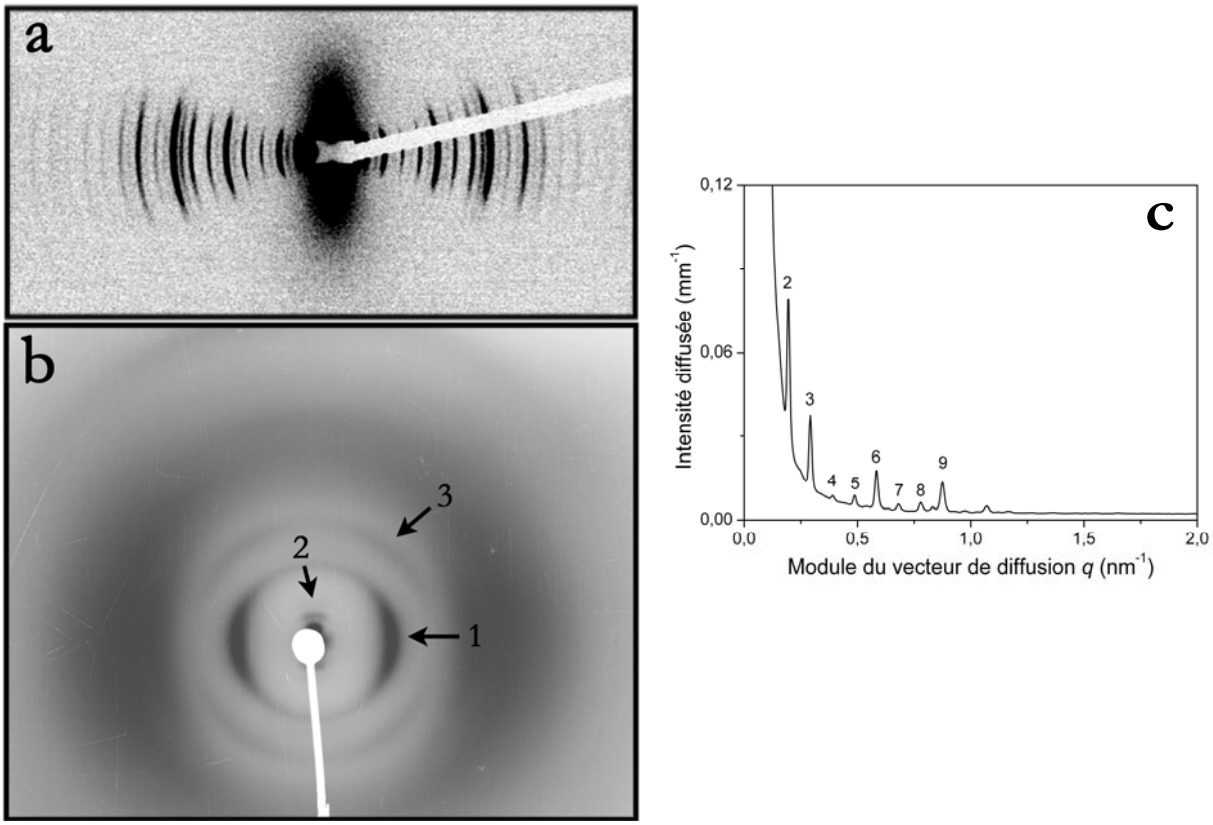


Figure 3 : Clichés de diffraction de fibrilles de collagène natives (tendons de queues de rat). (a) Cliché de diffusion aux petits angles obtenu sur ID02 à l'ESRF ($D_{\text{échantillon-détecteur}}$ = 3 m). Sur ce cliché, une trentaine d'harmoniques de la période axiale de 67 nm sont visibles. **(b)** Cliché de diffusion aux grands angles ($D_{\text{échantillon-détecteur}}$ = 10 cm, générateur à tube scellé). 1 : Ordre liquide latéral (d_{max}~1,23 nm) ; 2 : Harmoniques de 67 nm ; 3 : signal en croix relatif à l'hélicité des molécules (d_{max}~8,1 Å). Les spécimens que nous avons fait diffracter ne sont pas des monocristaux, mais sont composés de millions de fibrilles qui, bien que parallèles sont légèrement désalignées ; les réflexions de Bragg recueillies sont donc étirées en arcs de cercle. **(c)** Regroupement angulaire du cliché (a). Les pics indexés correspondent aux harmoniques de la période D = 67 nm.

Organisation latérale des triples hélices dans les fibrilles – L'organisation latérale des molécules de collagène à l'intérieur des fibrilles reste floue. D'une part certaines études montrent que cette organisation a des propriétés cristallines qui ont conduit à la proposition de modèles de microfibrilles constituant des sous-unités hélicoïdales formées de 4-5 triples hélices[19-21]. De telles microfibrilles ont été identifiées *in vitro* en tant qu'intermédiaires au cours de la fibrillogenèse[22-24] (voir § 4.1.3). D'autre part, il existe des indices selon lesquels les fibrilles possèdent des propriétés plus "liquides", qui incitent à considérer des modèles sans sous-structure. Des études de Résonance Magnétique Nucléaire du proton ^{2}H et du carbone ^{13}C ont ainsi démontré qu'il existait une importante mobilité dans les interactions moléculaires entre les molécules de collagène[25-27]. De même, le signal équatorial de diffraction des rayons X est un pic de corrélation d'ordre liquide (Figure 3b) qui correspond à un espacement de 1,1 à 2 nm suivant le taux d'hydratation des tissus étudiés. En effet, même si il n'y a pas d'ordre à grande distance, des interférences se forment à cause de l'ordre à courte distance qui résulte de la répulsion des triples hélices[28]. Ce signal peut être interprété comme provenant d'un arrangement des molécules sur un réseau quasi-hexagonal[29,30].

En outre, l'ordre de compaction dépend aussi largement du type de tissu étudié.

Conclusion sous forme d'avertissement – Nous avons tenté de présenter de façon simple quelques éléments spécifiques de la structure des fibrilles de collagène, étayés par de nombreux faits expérimentaux. Néanmoins cette vision est très schématique et n'explique qu'imparfaitement les clichés de diffraction les plus complets[31]. À ce jour, aucun modèle ne fait consensus, ni n'arrive à prendre en compte toutes les paramètres en jeu et notamment la périodicité axiale de 67 nm, l'ordre liquide latéral, la flexibilité des molécules, ou encore la frustration de l'hélicité des molécules[32]. Pour une comparaison plus vaste et détaillée, voir par exemple la référence 33. Aujourd'hui encore, de nouveaux modèles sont développés pour interpréter les clichés de diffraction X complexes[34].

4.1.2 La fibrillogenèse *in vivo*

Le processus de la fibrillogenèse *in vivo* est encore mal compris, d'autant plus qu'il est vraisemblablement intimement lié à la synthèse, au transport et aux modifications post-traductionnelles du collagène[35]. Actuellement deux hypothèses sont discutées, qui découlent de concepts et méthodes très différents.

La première hypothèse, fondée sur des observations en microscopies optique et électronique, postule que les fibrilles de collagène sont sécrétées telles quelles par les cellules ou bien polymérisées à partir de molécules de procollagène dans le cytoplasme[36]. Kadler *et al.*[37] ont plus récemment montré en microscopie électronique l'existence de protrusions de la membrane plasmique de cellules embryonnaires vers l'environnement extracellulaire, pouvant servir de « transporteurs » de fibrilles de collagène préformées et préalignées. Ces structures ont été baptisées « fibripositors ». Par ailleurs, les fibroblastes en culture sont capables de produire des fibrilles de collagène striées, mais, dans ce cas, ces dernières sont distribuées de façon aléatoire sur les boîtes de Petri sans montrer d'organisation suprafibrillaire particulière.

L'autre hypothèse décrit la fibrillogenèse comme un processus extracellulaire d'auto-assemblage de triples hélices de collagène, principalement gouverné par des forces physico-chimiques classiques. De nombreuses expériences *in vitro*, dont notre travail prend le relais, viennent soutenir cette théorie, qui permet d'expliquer le haut degré d'organisation suprafibrillaire de certains tissus. Toutefois, jusqu'ici, aucune observation *in vivo* n'est venu supporter cette hypothèse.

Il se peut éventuellement que la morphogenèse tissulaire soit contrôlée par ces deux aspects, dans des proportions différentes suivant les tissus considérés et des contraintes liées au confinement[38]. Par exemple, l'organisation des fibrilles de collagène dans le derme ne présente pas d'ordre particulier. Il n'est donc pas nécessaire d'invoquer *a priori* l'intervention d'une phase cristal-liquide.

4.1.3 Etude de la fibrillogenèse *in vitro* dans la littérature

Historiquement, si Nageotte semble avoir remarqué depuis la fin des années vingt que le collagène solubilisé pouvait reprécipiter[39], l'essor des recherches sur la fibrillogenèse date des années cinquante, en même temps que des protocoles d'extractions du collagène fiables étaient développés[40-42].

*Précipitation induite thermiquement (*Heat precipitation*)* – Traditionnellement, les études sur la fibrillogenèse ont été réalisées à partir de solutions salines neutres de collagène conservées à 4°C, qui ont comme propriété de précipiter sous forme de gel fibrillaire quand leur température est remontée à 37°C[40-42]. Les fibrilles composant ces gels présentent la périodicité axiale caractéristique du collagène à l'état natif.

Cependant Fessler[43] a montré que le produit de la précipitation pouvait être inhomogène et Cooper[44] reconnaît qu'une partie des triples hélices pouvait se dénaturer avant la température de dénaturation. Pour ces raisons, et pour ne pas nous éloigner trop du protocole établi pour l'étude de la phase cristal-liquide, nous n'avons pas suivi ce protocole expérimental. En effet, rester à 4°C est une condition trop contraignante pour le type d'expériences que nous avons voulu mettre en œuvre. De plus, dans les solutions salines neutres décrites, le collagène est souvent très dilué (0,2-2 mg/ml) et tout nous indique que dans le domaine de concentration que nous avons voulu étudier, le collagène n'est pas soluble à pH neutre, même à basse température. Nous avons de plus estimé (et constaté) que le risque de dénaturation était trop grand à 37°C.

Néanmoins, bien que nos conditions expérimentales soient assez éloignées, de nombreux résultats de cette littérature, notamment les mécanismes proposés, restent pertinents pour notre discussion.

Concentration – La plupart des études de la fibrillogenèse *in vitro* rapportées dans la littérature concernent des solutions diluées, dont les fibrilles sont éventuellement concentrées par centrifugation[45]. Cependant, certains travaillent à partir d'échantillons lyophilisés[46], ou simplement desséchés et réhydratés[47] après coup. Or, l'expérience nous a montré qu'une fois déshydraté, le collagène se redisperse mal en solution. L'originalité de notre approche consiste à travailler avec des solutions denses toujours maintenues hydratées, ce qui nous permet d'étudier non seulement la fibrillogenèse elle-même, mais aussi les fibrilles de collagène, et surtout leur organisation au sein des matériaux tridimensionnels alors obtenus, et qu'elles structurent.

Quelques mots de terminologie – Dans leur article de 1976, Comper et Veis[48] proposent la terminologie suivante pour décrire les différents niveaux d'organisation du système formé par les molécules de collagène, qu'ils relient avec les différentes étapes de la cinétique de formation des fibrilles.

Les solutions de collagène diluées initiales ne contiennent que des *monomères* de collagène (ou *triples hélices*) et éventuellement des agrégats[49,50]. Une demi-douzaine de triples hélices constitue une *microfibrille* de 5 nm de diamètre, dans laquelle les molécules sont supposées être déjà en

décalage périodique. Ensuite, quand le diamètre atteint 15-20 nm, on parle d'*agrégats de microfibrilles*, qui sont des agrégats filamenteux dans lesquelles les striations ne sont pas discernables. Enfin, dès que les striations sont visibles en microscopie électronique, on parle de *sous-fibres* et de *fibres* macroscopiques.

Comme beaucoup d'autres auteurs, nous avons pris des libertés avec cette terminologie pour décrire nos échantillons. Ainsi nous avons préféré qualifier de *nanofibrilles* les objets d'environ 10-40 nm de diamètre dont les striations périodiques ne sont pas perceptibles. Nous réservons le terme de *fibrilles* aux objets *uniques* dont la striation périodique est visible, quelle que soit leur taille et le terme de *fibres* aux agrégats qui semblent formés de plusieurs fibrilles. Ainsi, une petite fibre peut éventuellement posséder un diamètre inférieur à celui d'une grosse fibrille formée dans des conditions différentes.

Modèle mécanistique de la fibrillogenèse in vitro – Les traitements mécanistiques de la fibrillogenèse *in vitro* se basent sur des études cinétiques de précipitation induite thermiquement. Les courbes de croissance en fonction du temps obtenues en turbidimétrie[51], en mesure de biréfringence[52] ou en microscopie à force atomique[53] présentent toutes l'allure de sigmoïdes. Sur les courbes caractéristiques représentées en Figure 4, on peut distinguer trois phases : la phase de latence (*lag phase*), la phase de croissance (*growth phase*) et enfin un plateau final (*plateau*). Un tel profil suggère que la fibrillogenèse est un phénomène de nucléation et croissance[48] analogue à celui d'une cristallisation. De nombreux travaux ont illustré l'influence de différents paramètres physicochimique tels que la température, la concentration en collagène, l'ajout de sels mono- et multivalents ou d'autres additifs sur les caractéristiques de ces courbes.

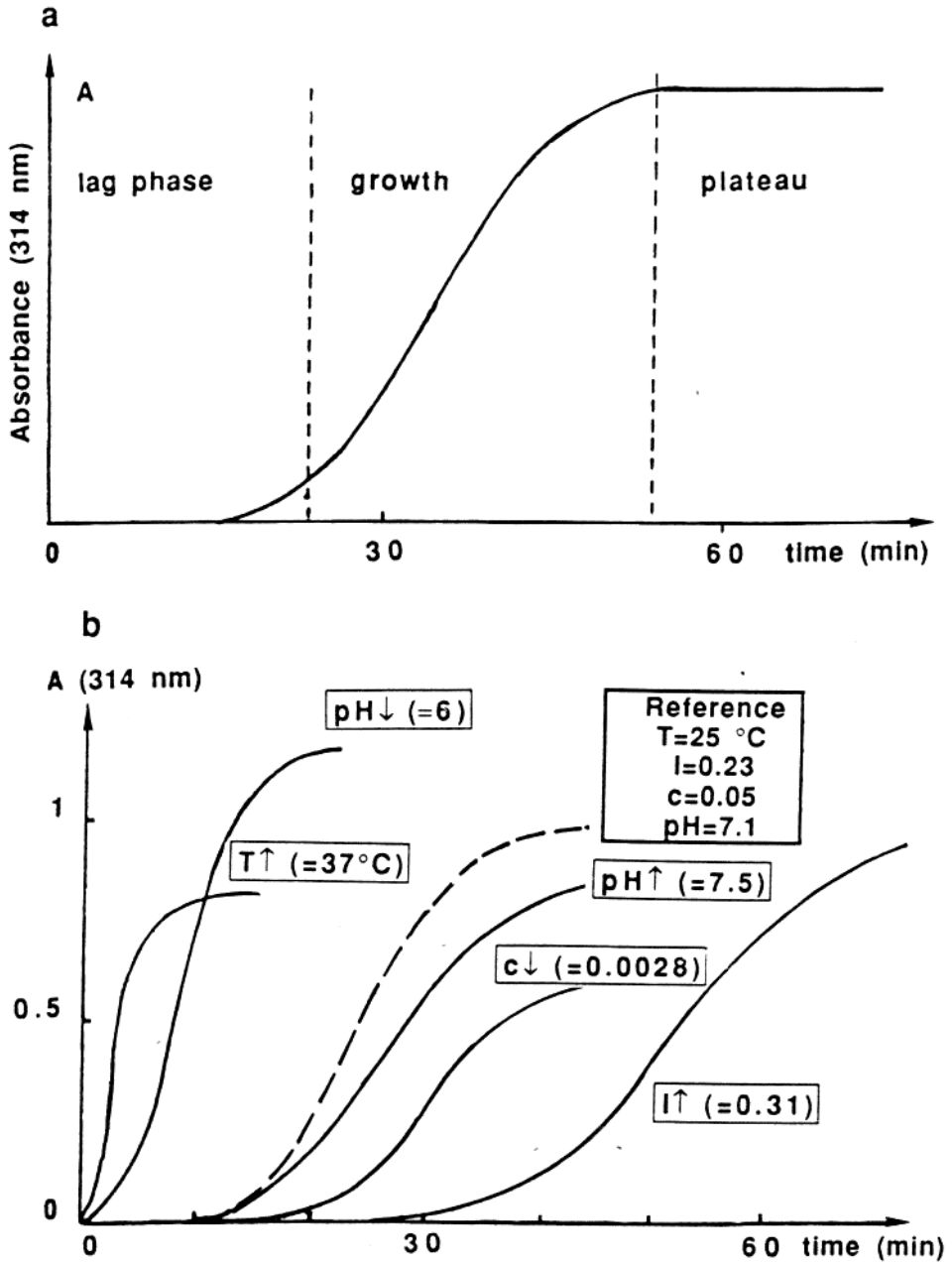


Figure 4 : Courbes de turbidité sigmoïdales typiques montrant une augmentation de la densité optique pendant la formation des fibrilles de collagène. a) les trois étapes du processus : nucléation (*lag phase*), croissance latérale (*growth phase*) et plateau. **b)** effet de différents paramètres (pH, température, force ionique et concentration) sur la cinétique d'agrégation du collagène en milieu dilué. Tiré de Djabourov *et coll.*[54]

L'analyse de ces données, corrélées avec des mesures de viscosité et la microscopie électronique, a permis à Gelman *et coll.* de proposer un mécanisme comprenant au moins trois étapes[55,56] :

i) La première étape, l'initiation, est dépendante de la température. Elle impliquerait la formation de sous-unités intermédiaires (ou microfibrilles) contenant de 5 à 17 molécules et dont la longueur serait de deux ou trois molécules[57,58]. Trelstad *et al*. en microscopie électronique, Silver[59] en diffusion

de lumière et Suarez par diffusion des rayons X ont démontré expérimentalement l'apparition de telles microfibrilles de 4,2 nm de diamètre avec le protocole de précipitation thermique. La sensibilité de la vitesse de formation des microfibrilles à la température serait la signature d'un processus guidé par l'entropie[60].

ii) La deuxième étape est indépendante de la température et implique la croissance linéaire de filaments ; elle n'est généralement pas associée à une augmentation de la turbidité mesurée par diffusion de lumière classique et a lieu pendant la phase de latence.

iii) La troisième étape, qui est associée à un changement de turbidité (phase de croissance), consiste en l'association latérale des filaments par un processus dépendant de la température.

iv) On peut aussi mentionner une quatrième étape de réticulation intermoléculaire, censée stabiliser la structure des gels. Cette réaction implique des bases de Schiff formant des ponts covalents entre des triples hélices adjacentes via les lysines et les hydroxylysines[61].

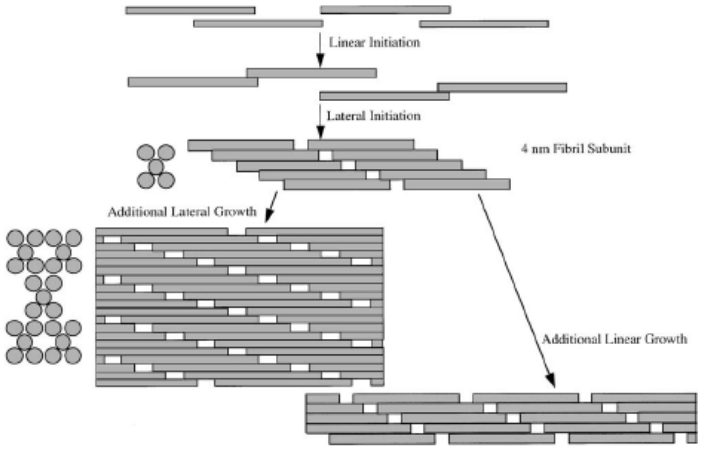


Figure 5 : Modèle mécanistique pour la fibrillogenèse *in vitro* du collagène de type I (tiré de Silver 2003[62]). Ce mécanisme implique deux étapes d'initiation linéaire et latérale dont résultent des dimères décalés et des sous-unités fibrillaires d'environ 4 nanomètres de diamètre. Ensuite, les fibrilles croissent par l'agrégation latérale et longitudinale des sous-unités. Les vitesses d'agrégation dépendent des conditions expérimentales. Le clivage des terminaisons non-hélicoïdales favorise la croissance latérale tandis que les réticulations favorisent la croissance linéaire.

Thermodynamique de la fibrillogenèse – Du point de vue thermodynamique, la fibrillogenèse est décrite comme étant un processus endothermique[44,63], contrôlée par la différence de potentiel chimique entre la solution de triples hélices et les points de nucléations.
Le processus est vraisemblablement rendu favorable par une large contribution positive de l'entropie, vraisemblablement liée à la réorganisation des molécules d'eau exclues par la précipitation des triples hélices. Les autres contributions au potentiel sont l'entropie d'exclusion qui est réduite par l'alignement des triples hélices dans la fibrille et les forces électrostatiques.
Plus récemment, S. Leikin et son équipe[46,64] ont aussi démontré l'importance des interactions hydrophiles dans la stabilité des fibrilles de collagène par des mesures de force d'hydratation.

Rôle des télopeptides – Si la séquence d'acides aminés de la partie centrale de la molécule est nécessaire pour la mise en place du décalage périodique des molécules de collagène à l'intérieur des fibrilles, d'autres paramètres interviennent dans la fibrillogenèse. Différentes équipes[65] ont montré que le clivage des télopeptides (unités terminales de la molécule après le clivage des propeptides) conduisait à une phase de latence plus longue, une vitesse de croissance réduite et surtout à des fibrilles moins bien formées. Il résulte de ces observations que les télopeptides jouent un rôle crucial dans la nucléation et certainement l'orientation initiale des molécules dans les agrégats.

La réticulation du collagène[66,67] – *In vivo*, la réticulation des molécules de collagène adjacentes a lieu dans les espaces extracellulaires, presque immédiatement après la fibrillogenèse.
Chimiquement, il s'agit d'une liaison covalente formée à partir de la chaîne latérale des lysines ou des hydroxylysines[68]. Les mêmes sites de réticulation sont conservés dans toutes les molécules de collagène fibrillaire (notamment I, II, III et V). Quatre localisations sont clairement établies : deux sites aldéhydes sont situés dans les télopeptides (extrémités non hélicoïdales de la molécule) et deux sites dans la partie hélicoïdale de la molécule.
Dans certains collagènes (III, IV, VI, VII), on trouve aussi des liaisons dissulfures intra- et intermoléculaires.
Ces liaisons covalentes intermoléculaires stabilisent les fibrilles de collagène et confèrent donc aux tissus conjonctifs des propriétés physiques et mécaniques supplémentaires. Elles sont indispensables au niveau structural. De plus, les réticulations participent aux processus de vieillissement. Ainsi, le nombre de réticulations augmente avec l'âge des tissus[69,‡]. Enfin, certaines maladies génétiques touchant les tissus conjonctifs ont été reliées à des dysfonctionnements dans

‡ C'est pour cette raison qu'il est préférable d'extraire le collagène d'animaux jeunes : la solubilité des tissus (tendons, peau) est directement reliée au nombre de réticulations.

les processus de réticulation. Ainsi, chez les patients touchés par certains syndromes d'Ehler-Danlos, le taux de réticulations dans le collagène de la peau ne représente qu'un quart du taux normal.

Autres « arrangements fibrillaires » – D'autres conditions de précipitation conduisent les molécules de collagène ou de pro/tropocollagène à former de longues fibrilles avec d'autres périodicités[70,71] que 67 nm, dont certaines sont de l'ordre de 200-300 nm (Figure 6). Les plus étudiées sont les « collagène fibreux à longue période » (FLS pour Fibrous Long Spacing) et « collagène segmentaire à période longue » (SLS pour Segment Long Spacing). Dans de tels édifices, les molécules sont en registre. Il ne faudrait pas pour autant en déduire que ces structures soient des artefacts uniquement observés *in vitro* : elles ont aussi été observées *in vivo*, à la fois dans des tissus normaux et pathologiques (voir les références citées par Paige *et coll.*[72]) et dans des cultures cellulaires[73]. Ces structures joueraient un rôle lors de la fibrillogenèse et pourraient aussi inhiber la minéralisation des tissus en question[74]. Pour un recensement plus complet, voir Doyle (1975)[75] ou Woodhead-Galloway (1982)[76].
Dans les conditions étudiées dans ce chapitre, nous n'avons jamais observé de telles structures.

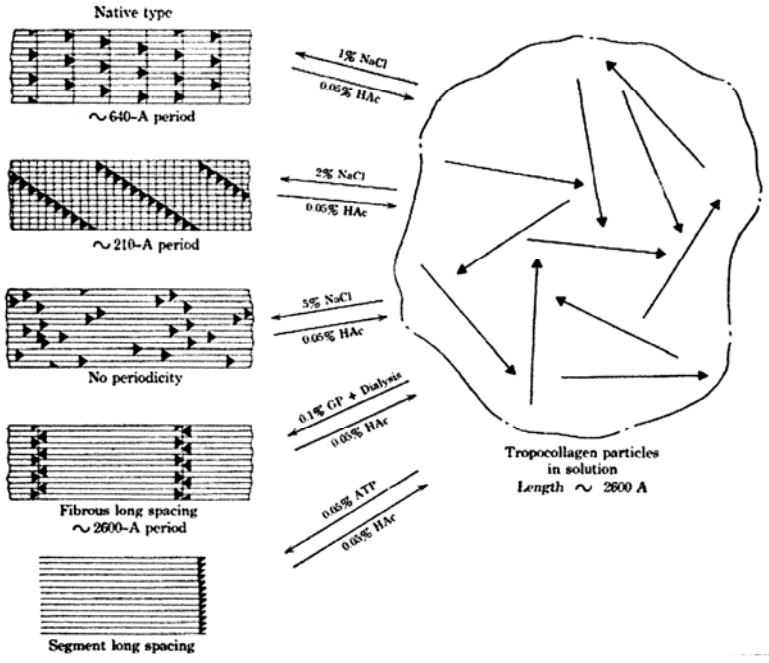


Figure 6 : Schéma des différents modes d'agrégation possibles des triples hélices dans des fibrilles formées *in vitro* sous différentes conditions. Les flèches représentent les triples hélices polarisées, la tête étant la terminaison N. Tiré de Glimcher 2006[77].

Rôle de molécules biologiques annexes – Si le collagène est le constituant majoritaire des matrices extracellulaires, ces dernières contiennent de nombreuses autres molécules biologiques régulant notamment la fibrillogenèse de façon cruciale. Parmi ces molécules, celles de la famille des protéoglycanes occupent le plus gros volume et forment un gel qui constitue la « substance de base » des matrices extracellulaires[78]. Les protéoglycanes résultent de la combinaison d'une protéine et de glycosaminoglycanes (chaînes polysaccharidiques non ramifiées). Outre leur rôle mécanique de résistance à la compression[79], la principale fonction connue et documentée des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes est la régulation du diamètre des fibrilles et de leur interdistance. Par exemple, Parry *et coll.*[80] ont montré la corrélation dans les tissus entre les petits diamètres de fibrilles et une forte concentration en acide hyaluronique et entre les grands diamètres de fibrilles et une forte concentration en dermatane sulfate.

Notons enfin la possibilité de visualiser les protéoglycanes fixés sur les fibrilles de collagène en microscopie électronique à transmission en colorant les coupes avec du bleu Cupromeronique/Cuprolinique[81] ou un mélange de rouge de ruthénium et de bleu alcian[82,83].
Enfin, notons que la revue de J. Scott (1988)[84] constitue une approche très intéressante des interactions entre les protéoglycanes et les collagènes fibrillaires.
Par ailleurs, *in vivo*, les fibrilles de collagènes sont majoritairement hétérotypiques et il a notamment été montré *in vitro* que les types de collagène minoritaires, comme le type V[85], contribuait à la régulation du diamètre des fibrilles. D'autres collagènes associés aux fibrilles, comme les collagènes XII et XIV interagissent eux-mêmes spécifiquement avec certains protéoglycanes, respectivement la fibromoduline[86] et la décorine[87].

4.1.4 Fibrillogenèse *in vitro* par clivage du procollagène

Plus récemment, des expériences de fibrillogenèse ont été menées directement à partir de procollagène[88-90]: Le procollagène est purifié depuis le milieu de culture de fibroblastes humains, puis clivé avec de la C-protéinase, ce qui génère du collagène *de novo* et induit la formation de fibrilles.

4.2 Préparation des échantillons / Protocole expérimental

Ici, il s'est agit de préparer des solutions acides de collagène plus ou moins concentrées, et d'induire la formation de fibrilles. Dans la plupart des cas, cela a été réalisé en remontant le pH des solutions, à 20°C. La seule exception est présentée au paragraphe 4.3.3, où la formation de fibrilles striées est obtenue pour des concentrations élevées en collagène, à pH acide.

Préparation des solutions acides – Les solutions de collagène de différentes concentrations ont été préparées par dialyse d'une solution stock à 5 mg/ml contre des solutions de polyéthylène glycol 35 kD (PEG, Fluka) solubilisés dans le même solvant (acide acétique, 500 mM). Le seuil de coupure des pores des membranes de dialyse en cellulose (Cellu-Sep) était de 3,5 kD ceci notamment afin d'exclure totalement le risque de diffusion du PEG vers la solution de collagène. La concentration des solutions a été évaluée par dosage à l'hydroxyproline *avant* d'induire la fibrillogenèse.
Les solutions acides ont été aspirées dans des capillaires en verre quand cela était possible : entre 40 mg/ml et 150 mg/ml. À des concentrations inférieures, les solutions forment des gels trop lâches et au-delà elles deviennent trop élastiques pour être aspirées.

Diffusion de vapeurs – Une manière pratique d'induire la fibrillogenèse est de soumettre les solutions acides à des vapeurs d'ammoniac[1,91]. Les vapeurs, en se solubilisant dans le solvant, neutralisent l'acide acétique et induisent une augmentation de pH. Cette méthode permet de gélifier des solutions peu accessibles *in situ*, sans risque de dilution. Néanmoins, elle ne permet pas de contrôler les conditions physico-chimiques telles que le pH et la force ionique du système. Le pH en particulier est susceptible d'atteindre des valeurs élevées correspondant à la saturation de l'eau d'hydratation par l'ammoniac, soit un pH d'environ 11,4.

Dialyse contre un tampon – La méthode de fibrillogenèse la plus fréquemment utilisée pour ce travail revient à dialyser un petit volume des solutions acides de collagène contre un grand réservoir d'une solution tamponnée, dont le pH et la force ionique sont connus.
En pratique, dans le domaine de concentration principalement étudié (à partir de 40 mg/ml), les solutions sont tellement denses et le collagène tellement insoluble dans le tampon de fibrillogenèse qu'il n'a même pas été nécessaire d'utiliser de membrane de dialyse : les « solutions concentrées » (en réalité de véritables gels physiques dans le domaine de concentrations étudié, voir chapitre précédent) ont tout simplement été mises en contact avec les solutions tampons par

immersion pendant au moins 48 heures à 20°C. De plus, la cinétique de neutralisation des gels est très rapide, probablement seulement limitée par la diffusion des ions dans les gels.
Le PBS (« Phosphate Buffer Saline »), est le tampon de référence, que nous avons le plus fréquemment utilisé.

Outre l'influence de la concentration en collagène sur la fibrillogenèse, nous avons voulu évaluer celle du pH et de la force ionique des tampons de fibrillogenèse.
Deux séquences en pH ont été préparées :

- La première, en milieu acide est essentiellement une solution d'acide acétique à 500 mM. Le pH d'une telle solution est 2,5. En ajoutant quelques gouttes de soude concentrée (10 M), le pH est remonté à 4, 4,5 et 5. Si ces solutions ne constituent pas des tampons à proprement parler, nous avons vérifié que le pH du bain restait constant au cours de l'expérience. La force ionique essentiellement liée à la dissociation de l'acide acétique n'est pas connue précisément. On estime qu'elle est de l'ordre de 3 mM, donc beaucoup plus faible que tous les tampons phosphates préparés (> 24 mM).
- La seconde, couvrant la zone de pH 6,2 à 13 est préparée avec des tampons phosphates de force ionique fixée à 587 mM.

Deux séquences en force ionique, avec le pH fixé à 7,4, ont été préparées (voir Tableau 1) :

- D'une part en ajustant la force ionique en augmentant la concentration du tampon phosphate de 10 mM à 500 mM.
- D'autre part en ajoutant du chlorure de sodium (NaCl) à une base de 200 mM de tampon phosphate.

Les échantillons ont été mis en contact avec les tampons de fibrillogenèse pendant au moins 48 heures.

I (mM)	*24*	*127*	*261*	*529*	*793*	*1300*	*522*	*600*	*800*	*1000*	*1200*
Na_2HPO_4 (mM)	10	50	100	200	300	500	100	200	200	200	200
NaCl (mM)	0	0	0	0	0	0	258	70	271	474	677

Tableau 1 : Composition des différents tampons de fibrillogenèse utilisés dans l'étude de l'influence de la force ionique. Le pH est ajusté à 7,4 avec quelques gouttes de soude ou d'acide chlorhydrique concentré.

Une partie des gels fibrillaires ainsi formés a été fixée et incluse pour la microscopie électronique dès leur sortie du tampon de fibrillogenèse (Chapitre 1, § 1.3.3). Une autre a été stockée dans des capillaires pour rayons X, scellés à la flamme, et conservés à 4°C. Ainsi, les échantillons restent hydratés pendant plusieurs mois et peuvent éventuellement être placés dans une chambre sous vide pour réaliser des expériences de diffusion des rayons X.
Il est à noter que ni la diffusion de vapeur ni la dialyse ne permettent de s'affranchir de la formation d'un front de neutralisation, associé à un gradient de pH. La formation des fibrilles que nous étudions ici se produit donc au niveau d'une interface plus ou moins diffuse, et qui progresse dans l'échantillon en plusieurs minutes ou heures, selon la méthode utilisée, la concentration et l'épaisseur des solutions.

Évaluation de la transmittance optique – Dans le but d'évaluer la turbidité de nos échantillons avant et après la fibrillogenèse, nous avons effectué des mesures de transmission de lumière sur les solutions et les gels fibrillaires de collagène. Cette mesure, qui n'est qu'une estimation brute, rend à la fois compte de l'absorption des échantillons et de la diffusion de la lumière par des objets de taille microscopique.
Pour ce faire, les échantillons acides ont été placés dans une microcellule en quartz de 100 µm d'épaisseur intérieure. La fibrillogenèse a été induite *in situ* en soumettant les solutions acides à des vapeurs d'ammoniac pendant une nuit. Les échantillons ont été observés au microscope optique avant et après la fibrillogenèse. La source lumineuse était une lampe au sodium non monochromatique[§] et polarisée linéairement. La transmission a été estimée sur les images à l'aide de la fonction "Measure" du software gratuit *ImageJ*[92] (http://rsb.info.nih.gov/ij/), qui convertit les pixels RGB en valeurs de luminosité avec la formule $V=(R+G+B)/3$. Une vingtaine de mesures ont été réalisées sur des régions homogènes du champ observé. La transmission $\Delta T\% = 100\%$ correspond à la normalisation de la luminosité mesurée sur de l'acide acétique à 500 mM.

[§] Traditionnellement, les mesures de turbidimétrie sont réalisées avec une source monochromatique $\lambda = 313$ nm.

4.3 Résultats et discussion

Les résultats présentés ci-dessous rendent essentiellement compte d'une étude systématique de l'influence de paramètres physico-chimiques sur la fibrillogenèse, à l'aide de deux techniques complémentaires : la diffusion des rayons X et la microscopie électronique à transmission. Pour éviter les répétitions trop nombreuses, nous présenterons au préalable les traits communs à la plupart des échantillons dans deux premières sous-parties instrumentales. Ensuite, nous décrirons comment chacun des paramètres physico-chimiques (concentration, pH et force ionique) modifie ces caractéristiques.

4.3.1 Diffusion des rayons X

La diffusion des rayons X est une méthode rapide pour caractériser nos échantillons, juger de leur nature fibrillaire, de l'abondance et de la structure des fibrilles. Néanmoins, la forte hydratation des gels et la faible fraction volumique en collagène (de 0,05% à tout au plus 30%), rend l'usage d'un rayonnement synchrotron une fois de plus nécessaire pour une étude systématique. Toutefois, le signal de corrélation latéral peut être assez facilement détecté en laboratoire à l'aide d'un montage à anode tournante (cuivre ou molybdène) en plaçant l'échantillon dans une chambre sous vide pour réduire la diffusion par l'air. Le signal de la périodicité axiale n'est quant à lui obtenu que dans les conditions d'échantillon les plus favorables et seulement les deux ou trois ordres les plus intenses. Ainsi, l'essentiel des résultats de SAXS présentés ici ont été obtenus sur la ligne ID02 à l'ESRF.

Des clichés de diffusion des rayons X typiques sont présentés dans les Figure 7 et Figure 8. Le signal est anisotrope parce que les solutions (nématiques) acides ont été alignées par cisaillement avant leur neutralisation. En plus des caractéristiques spécifiques décrites ci-dessous, remarquons le très fort signal de diffusion anisotrope aux petits angles provenant de la présence de gros agrégats.

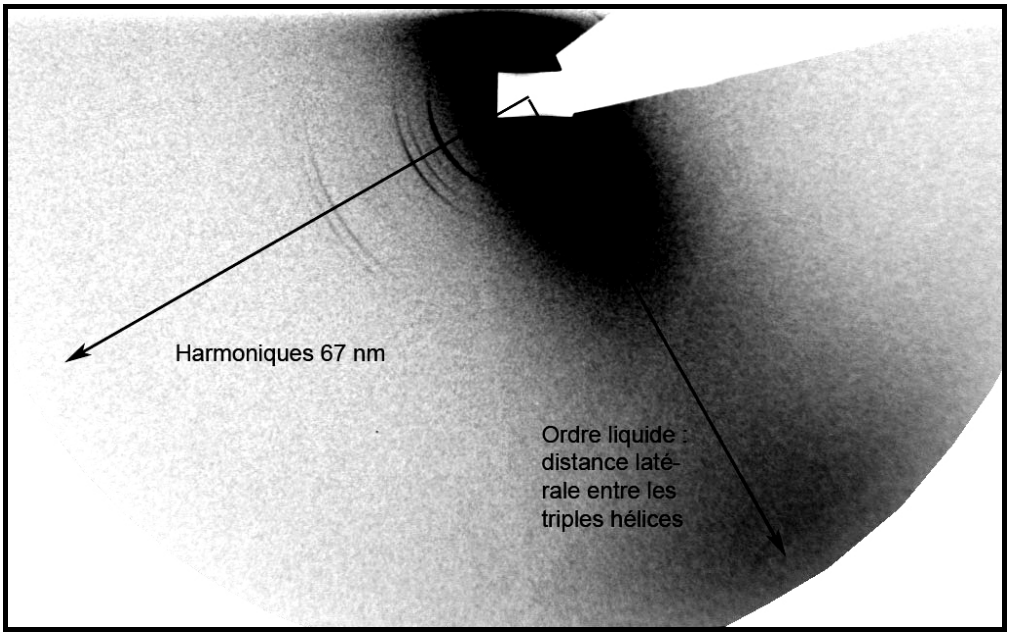


Figure 7 : Cliché typique de diffusion des rayons X par un gel de collagène fibrillaire. Le gel a été préparé en immergeant une solution acide de 100 mg/ml de collagène dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*). La solution acide (nématique) a préalablement été aspirée dans un capillaire.

Pic de corrélation latéral (signal équatorial) – Tous les gels donnent lieu à un large pic de corrélation résultant d'un ordre dans le domaine de q [3,8-5,2 nm^{-1}], ce qui correspond dans l'espace réciproque à des distances $d_{Bragg} = 2\pi/q$ = 1,2-1,7 nm. Si l'on suppose un simple empilement hexagonal des molécules localement à l'intérieur des fibrilles, nous pouvons estimer la distance moyenne entre les triples hélices, d_{moy}, avec la formule :

$$d_{moy} = d_{Bragg} \times \frac{2}{\sqrt{3}}$$

En réalité, pour être totalement rigoureux, il faudrait déconvoluer la forme du pic à l'aide d'un modèle adéquat tenant compte du facteur de forme des triples hélices et de fonctions d'orientation et de corrélation de position. Néanmoins, ces corrections affecteraient de façon marginale les tendances observées, aussi, nous nous sommes contentés de la simple formule évoquée ci-dessus.

La longueur de corrélation latérale $\xi = 2\pi/\Delta q$ est de l'ordre de 4-5 nm.

Toutefois, la seule observation de ce signal ne suffit pas à démontrer la nature fibrillaire des gels. En effet, ce type de signal est aussi obtenu par la diffraction d'agrégats désordonnés formés en précipitant les triples hélices avec des sels (voir purification du collagène).

Réflexions périodiques axiales (signal méridional) – L'observation de pics de diffraction correspondant à la périodicité intrafibrillaire axiale démontre de façon claire que des fibrilles de collagène semblables à celles observées *in vivo* ont été formées. Parmi toutes nos données, nous avons pu détecter jusqu'au trentième ordre. En revanche, le premier ordre, correspondant à d_{Bragg} = 67 nm est attendu en bord de piège où il est masqué par une très forte diffusion aux petits angles. Un profil d'intensité linéaire correspondant au cliché de la Figure 8a est présenté dans la Figure 8b. L'intensité diffusée y est tracée en fonction du module du vecteur de diffusion *q*. Les pics numérotés 2 à 9 correspondent aux réflexions de Bragg produites par l'empilement périodique des triples hélices dans les fibrilles. Pour comparer les différentes conditions, nous nous sommes concentrés sur les ordres les plus intenses où la ligne de base est plate, soit les sixième et neuvième ordres.

Sur les pics les plus intenses, nous avons calculé une longueur de corrélation au plus de l'ordre du micron, tant sur les clichés de diffraction de nos échantillons préparés *in vitro* que sur ceux enregistrés sur un faisceau de tendons de queue de rat. Cette distance correspond seulement à une quinzaine de périodes *D*, ou encore la longueur de 3 à 4 molécules de collagène.

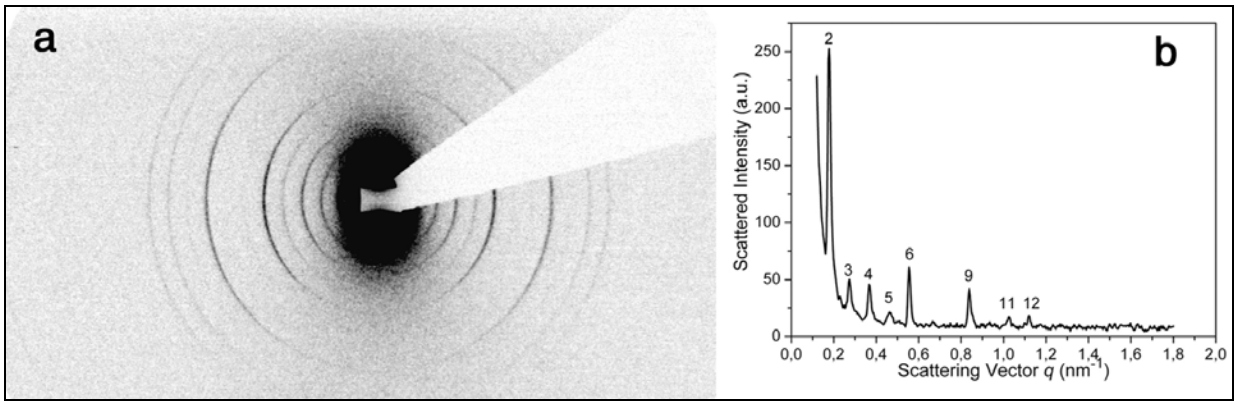


Figure 8 : (a) Cliché de diffusion des rayons X par un gel fibrillaire de collagène à 145 mg/ml et **(b)** le profil linéaire correspondant de l'intensité diffusée *I* en fonction du module du vecteur *q* pris le long de l'orientation axial. Les ordres des différentes harmoniques de la périodicité axiale *D* de 67 nm sont indexés.

Comparaison avec les fibrilles natives de collagène – Il est très important de souligner ici que les fibrilles de collagène que nous reformons *in vitro*, bien que présentant la même périodicité axiale des triples hélices en leur sein, ne sont pas strictement similaires. Une indication nous en est donnée par les intensités relatives des pics de diffraction axiale. En effet, les harmoniques renforcées ne sont pas les mêmes que celles observées dans les tissus *in vivo*. Alors que sur nos clichés de tendon ces renforcements correspondent aux ordres 3-6-9 (Figure 3c), dans nos échantillons l'ordre 4 parait renforcé au détriment de l'ordre 3. Notons toutefois que de

précédents travaux[93-95] rapportent dans le tendon des renforcements des ordres 3-5-9. En revanche, Kuznetsova *et al.* notent une augmentation relative de l'intensité de l'ordre 6 avec des fibrilles reconstituées qu'ils attribuent au clivage des télopeptides conduisant à l'élargissement de la région des gaps.

Dégâts d'irradiation – À titre de précaution, nous avons vérifié que le très brillant rayonnement synchrotron ne causait pas de dégâts d'irradiation dans les gels fibrillaires de collagène étudiés dans ce chapitre. En effet, dans un gel, l'énergie apportée par le rayonnement peut se dissiper sous forme de chaleur ou créer des radicaux libres et endommager l'échantillon. Pour ce faire, nous avons irradié une même zone d'un échantillon de collagène fibrillaire à 300 mg/ml pendant 20 × 0,5 seconde. À l'issue de cette séquence, nous n'avons pas observé la moindre différence entre le premier et le dernier spectre acquis.

4.3.2 Microscopies électroniques

Microscopie Electronique en Transmission – Les gels fibrillaires denses ont aussi été caractérisés par microscopie électronique à transmission, qui fournit des informations supplémentaires sur leur structure microscopique, notamment sur la taille et la distribution des fibrilles.
Quand le diamètre des fibrilles est assez grand, les striations dues à l'organisation des molécules au sein des fibrilles sont clairement visibles sur les coupes transverses. En dessous de 30-40 nm, ces striations sont difficilement discernables, sans pour autant être inexistantes, puisque nous avons pu détecter le signal correspondant en diffusion des rayons X. Les dimensions mentionnées dans le cours du texte ne sont que des estimations du fait de la relative polydispersité des diamètres des fibrilles et de leur orientation dans le plan de la coupe. Ceci nous a empêché toute analyse automatisée. Ces dimensions ont été mesurées « manuellement » sur des micrographies représentatives.

Microscopie Electronique à Balayage – Une particularité des gels de collagène dont la microscopie électronique à transmission rend compte de façon incomplète est leur structure tridimensionnelle. En effet, sur les clichés réalisés à des concentrations allant de 40 à 150 mg/ml, nous ne voyons qu'une section du matériau, où les fibres et fibrilles semblent isolées les unes des autres. Or, le matériau est bien un gel percolant, certes poreux mais cohérent, différent en cela d'une suspension de fibrilles comme pourraient le laisser suggérer certains clichés en transmission. En réalité, il faut se représenter les fibrilles de collagène comme des points de réticulations qui sont connectés entre eux par des triples hélices ou des microfibrilles communes.
La Figure 9 donne une vision microscopique plus directe de la structure de nos gels formés à deux concentrations différentes. Ces clichés donnent une idée de la structure tridimensionnelle complexe des gels fibrillaires de collagène que nous avons étudiés dans ce chapitre. Très qualitativement, nous pouvons constater que le diamètre des fibrilles est plus gros à 80 mg/ml qu'à 30 mg/ml. Par ailleurs, l'organisation des gels dépend clairement de celle de la phase liquide initiale ; à 30 mg/ml les fibrilles sont isotropes, tandis qu'à 80 mg/ml elles conservent l'alignement de la phase nématique. Cependant, nous ne ferons de ces images qu'un usage illustratif, car elles ne donnent qu'une vision superficielle des gels, qui ne représente pas forcément le volume. En effet, la surface est souvent très modifiée par des effets d'ancrage contre les surfaces de verre, par la manipulation des solutions avant la fibrillogenèse, et enfin lors de leur préparation par séchage supercritique avant l'observation au MEB.

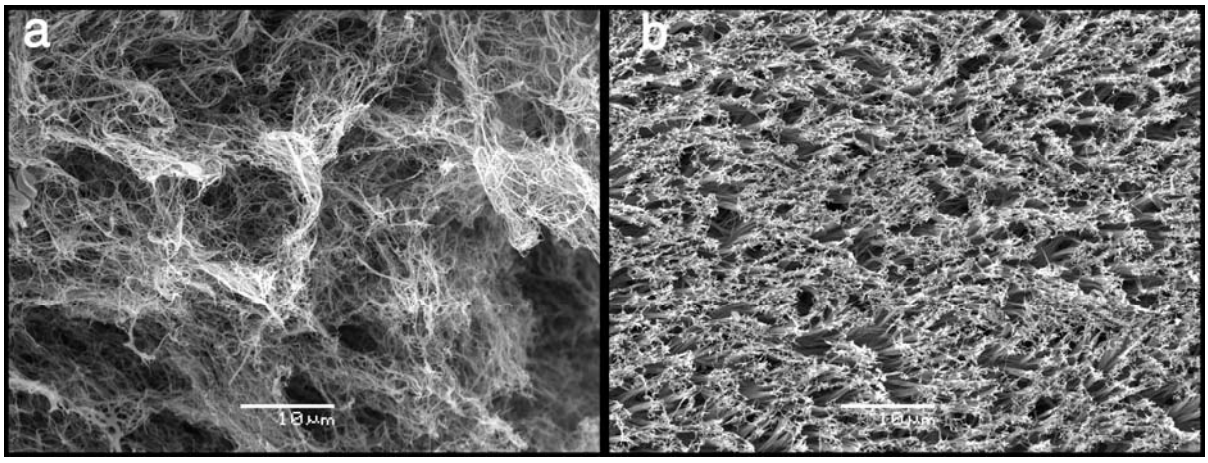


Figure 9 : Images de gels fibrillaires obtenues en microscopie électronique à balayage (a) À 30 mg/ml, l'orientation des fibrilles est isotrope. **(b)** A 80 mg/ml, les fibrilles ont conservé l'orientation imprimée à la solution acide initiale.

4.3.3 Influence de la concentration en milieu acide

Observations optiques –- Les solutions acides de collagène sont transparentes et incolores jusqu'à des concentrations aussi élevées que 100-150 mg/ml. Au-delà, les solutions peuvent prendre une coloration rosée ou jaunâtre suivant l'extraction, sans que nous ayons pu déterminer si cela provenait du collagène lui-même ou d'un éventuel contaminant[**]. Plus significativement, à partir de 150-200 mg/ml, les solutions (concentrées par dialyses) deviennent turbides. Nous avons estimé qu'à ces concentrations la transmittance chute brutalement de 98±2% à 55±5% (Cf. le graphe dans la Figure 12c). Par conséquent, nous en déduisons que nos échantillons ne sont alors plus homogènes et que des agrégats s'y forment. En revanche, au-delà de cette limite la turbidité ne semble pas augmenter.

Diffusion des rayons X – La diffusion des rayons X par ces solutions concentrées acides et turbides de collagène nous donne une indication non équivoque sur la nature de ces agrégats. Sur la plupart des clichés, nous retrouvons en plus d'un fort signal de diffusion aux très petits angles les harmoniques du signal caractéristique de la périodicité axiale de 67 nm observée dans les fibrilles striées (Figure 10).

En ce qui concerne le signal latéral d'interdistance moléculaire, il n'est pas toujours détectable. Ce signal est de même nature que le signal de corrélation étudié dans le chapitre 2. Il correspond à un ordre liquide et apparaît dans un régime répulsif. Aussi, nous avions interprété l'affaiblissement de ce signal aux fortes concentrations (~160 mg/ml) comme dû à la gélification du système et à une entrée dans un régime attractif. Nous voyons ici que cette interprétation se confirme : ce nouveau régime attractif conduit à la formation d'agrégats fibrillaires qui eux-mêmes contribuent à augmenter davantage l'élasticité des solutions. Pour autant, le signal d'interdistance intrafibrillaire (~1,7 nm) n'est pas observable dès l'apparition des réflexions à 67 nm. Nous ne retrouvons sa trace qu'au-delà de 300 mg/ml. L'absence de ce signal aux concentrations intermédiaires s'explique sans doute par la faible proportion de fibrilles présentes dans la solution de triples hélices. En outre, la faible longueur de corrélation de l'ordre liquide latéral dans les fibrilles rend le signal bien plus diffus que celui de la périodicité axiale qui produit des pics de diffraction de Bragg.

[**] Par exemple, la couleur rosée pourrait s'expliquer par des traces d'hémoglobine.

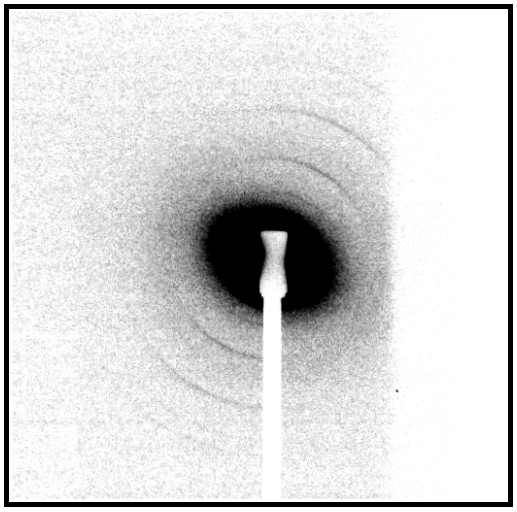


Figure 10 : Signal de diffusion des rayons X aux petits angles d'une solution acide à 300 mg/ml. Les harmoniques correspondant à la périodicité axiale de 67 nm sont clairement visibles.

Microscopie électronique – L'observation de solutions concentrées acides de collagène en microscopie électronique sur coupes et répliques de cryofractures confirme bien les résultats précédents. Par exemple, sur la Figure 11, nous pouvons clairement voir des fibrilles striées insérées dans un milieu dense continu. Ici, l'échantillon a été fixé par immersion dans un bain de glutaraldéhyde tamponné à pH 7,4. La fixation d'un échantillon consiste à établir des liaisons covalentes entre triples hélices par la réaction des deux fonctions du glutaraldéhyde avec des fonctions amines portées par deux molécules distinctes (Cf. Chapitre 1, § 1.3.3). La solution de fixateur étant tamponnée à pH neutre, la neutralisation du milieu a donc lieu simultanément. Les fibrilles que nous observons auraient donc pu être générées lors de l'étape de fixation. Néanmoins, nous pensons que les fibrilles observées ne sont pas des artefacts car l'échantillon apparaît homogène et parce que nous n'avons pas observé de fibrilles striées sur d'autres échantillons acides moins concentrés et fixés de la même façon. Par ailleurs, il apparaît que la cinétique d'apparition de fibrilles striées est bien plus lente que celle de la neutralisation (Cf. § 4.3.8). Rappelons que l'observation de fibrilles striées en MET vient essentiellement confirmer l'observation du signal correspondant par SAXS sur des échantillons non fixés. Enfin, l'observation de répliques de cryofractures est cohérente avec les images de coupes classiques. Même si nous n'avons pas encore observé les striations typiques, il apparaît clairement de grands objets fibrillaires indiquant que la solution n'est plus parfaitement homogène, même sans étape de fixation chimique.

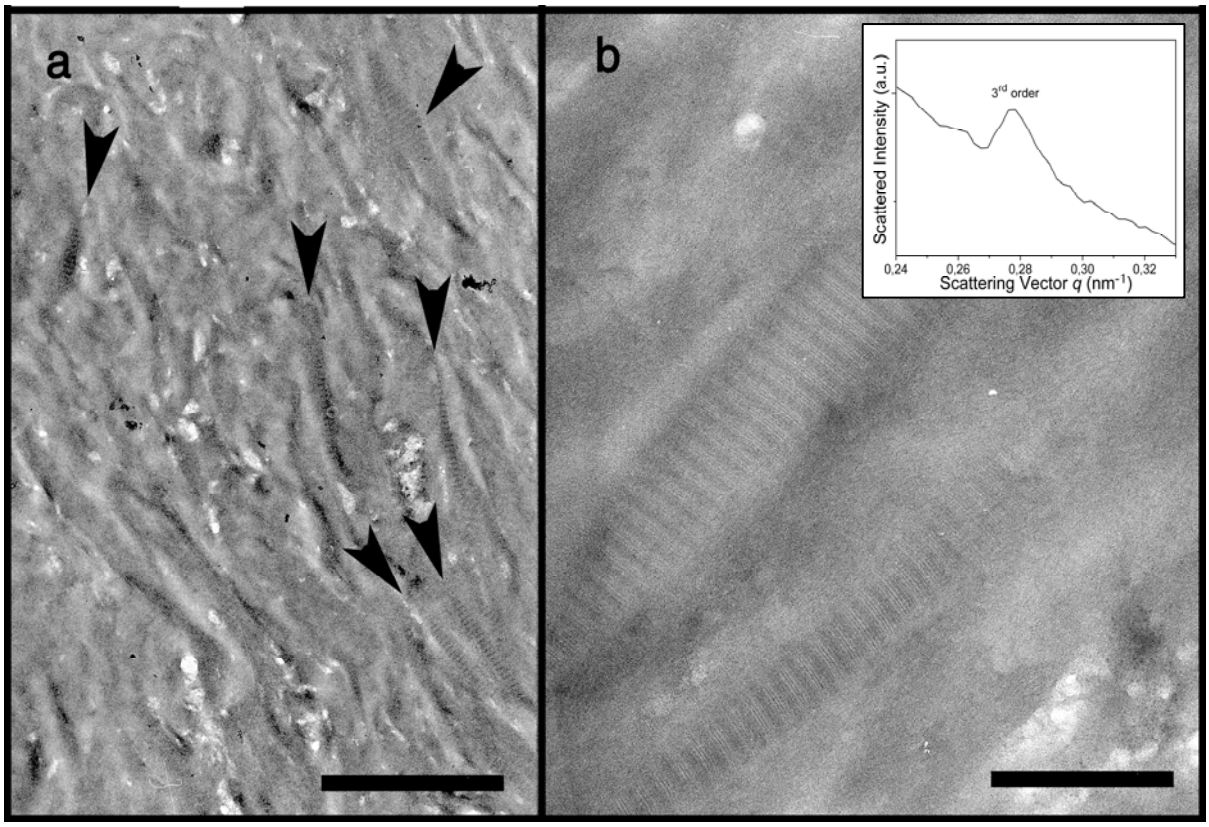


Figure 11 : Apparition de fibrilles striées en milieu acide (environ 180 mg/ml de collagène dans 5 mM d'acide acétique). Les flèches noires attirent l'attention sur les fibrilles striées qui apparaissent insérées dans un milieu dense de triples hélices. **(a)** Faible grandissement. Barre = 2 µm **(b)** Fort grandissement. Barre = 430 µm. En insert : le troisième ordre du signal de diffraction axial caractéristique des fibrilles de collagène.

Discussion – Ces observation complètent celles déjà faites sur des solutions de collagène complètement desséchées : tout comme R. Martin dans son mémoire de thèse[96], nous avions pu nous rendre compte que le cliché de diffraction d'une phase nématique séchée était semblable à celle d'un échantillon fibrillé, tandis que M.-M. Giraud-Guille montre des clichés de microscopie électronique de collagène séché présentant des striations correspondant à une période de 7,7 nm (Voir par exemple la figure 5 de M.-M. Giraud-Guille 1989[97]). Ici nous avons pu observer cette transition en solution.

L'apparition d'objets aussi organisés que des fibrilles de collagène au sein d'une phase cholestérique suggère l'existence d'une nouvelle transition de phase lyotrope à des concentrations bien supérieures à celles de la transition isotrope/nématique chirale. En effet, bien que la structure d'une fibre de collagène ne ressemble pas à première vue à une phase smectique A (Cf. figure 1d dans le chapitre 2), elle en possède bien les caractéristiques structurales, en termes de propriétés de symétrie, et a donc été décrite comme telle par Hukins et Woodhead-Galloway[98,99]. En effet, si les molécules ne sont pas réparties dans des lamelles, la phase présente bien une forte périodicité axiale et un ordre latéral de type liquide.

Bien sûr, nous manquons de données thermodynamiques permettant de décrire l'apparition de fibrilles comme une transition de phase à part entière, comme cela a pu être fait pour des suspensions de virus[100]. Néanmoins, cette description nous semble plus juste que celle consistant à parler d'agrégation, qui ne rend pas compte de l'ordre des molécules dans les « agrégats » fibrillaires. Une dernière approche consisterait à considérer que nous avons atteint la limite de solubilité du collagène et à décrire la formation de fibrille comme une cristallisation. Il reste néanmoins que l'ordre local de type liquide dans les fibrilles, natives et reconstituées *in vitro*, fait qu'il est difficile de parler dans ce cas de cristaux solides.

4.3.4 Influence de la concentration en milieu neutre et basique

Observations optiques – Quand la fibrillogenèse est induite par remontée de pH, les solutions concentrées de collagène deviennent fortement turbides, comme illustré dans la Figure 12. La turbidité indique que des fibrilles ou au minimum des agrégats de plusieurs dizaines de nanomètres se sont formés. Comme nous l'avons vu plus haut, la turbidimétrie est une méthode de choix pour des études cinétiques de fibrillogenèse en milieu dilué. Dans notre cas, un tel suivi cinétique n'était pas approprié du fait de l'existence d'un front de diffusion qui met plusieurs heures à traverser tout l'échantillon. Nous nous sommes donc contentés d'estimer la turbidité de l'état initial et de l'état final (Cf. § 4.2). Les résultats sont reportés dans le graphe de la Figure 12.
En dessous de 50 mg/ml, la diffusion de la lumière est très faible et la transmission de la lumière *T*% chute seulement de 98-100% à 85-92% après que la fibrillogenèse ait été induite. Au dessus de 50 mg/ml, *T*% chute violemment jusqu'à 20-30%. La plus faible valeur de *T*% est obtenue à 150 mg/ml, où la transmission est quasi-nulle. Au-delà de cette valeur, à 210 et 300 mg/ml, les gels sont moins opaques (*T*% = 15-20%) et Δ*T*% est aussi plus faible car les solutions acides sont déjà turbides (*T*% = 56%).

Diffusion des rayons X – De façon inattendue, nous avons observé que l'interdistance moyenne d_{moy} était plus grande dans les gels formés à partir des solutions les plus concentrées (Figure 13). En effet, alors que d_{moy} est de l'ordre de $1{,}60 \pm 0{,}05$ nm dans le domaine de concentration 5-150 mg/ml, elle atteint 1,75-1,80 nm à partir de 200 mg/ml.
Par ailleurs, l'intensité relative des pics de la périodicité axiale peut varier avec la concentration, mais leur position reste constante.

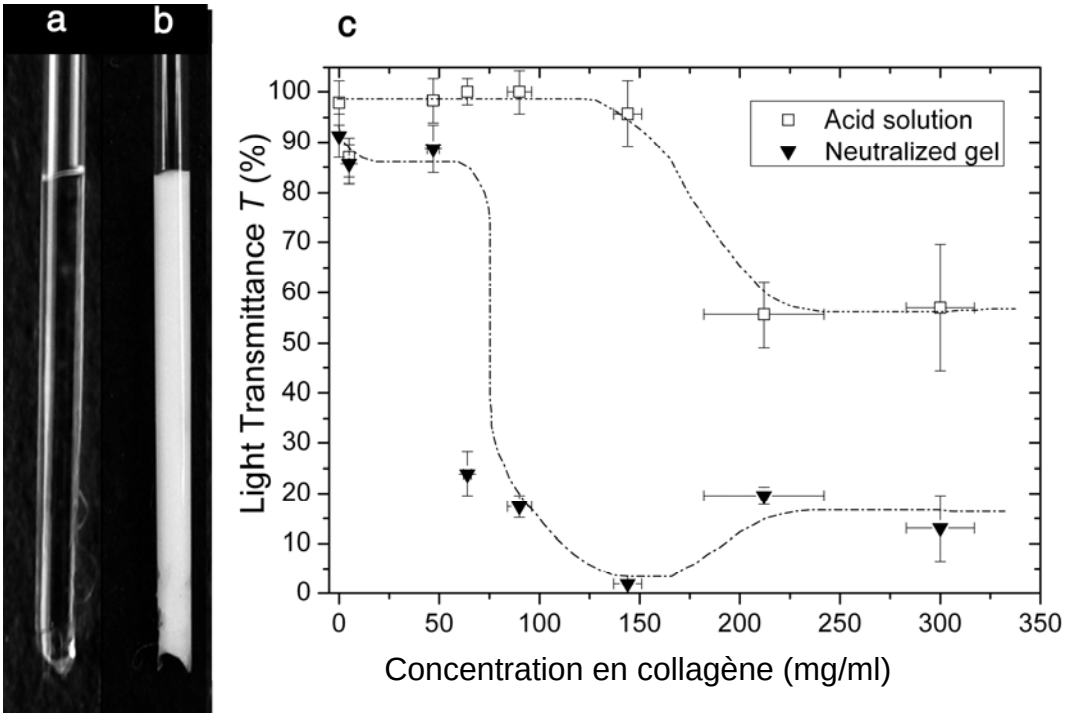


Figure 12 : Comparaison de la transmission de la lumière par les solutions acides initiales et les gels fibrillaires correspondants. (a-b) La photographie de solutions de collagène à 90 mg/ml avant (a) et après (b) la remontée de pH illustre le changement de turbidité induit par la fibrillogenèse. (Diamètre du capillaire = 2 mm). **(c)** Nous avons reporté dans ce graphe les mesures de transmission de la lumière en fonction de la concentration en collagène pour des solutions acides (□) et pour les gels fibrillaires correspondant (▼). Les lignes pointillées sont des guides pour l'oeil.

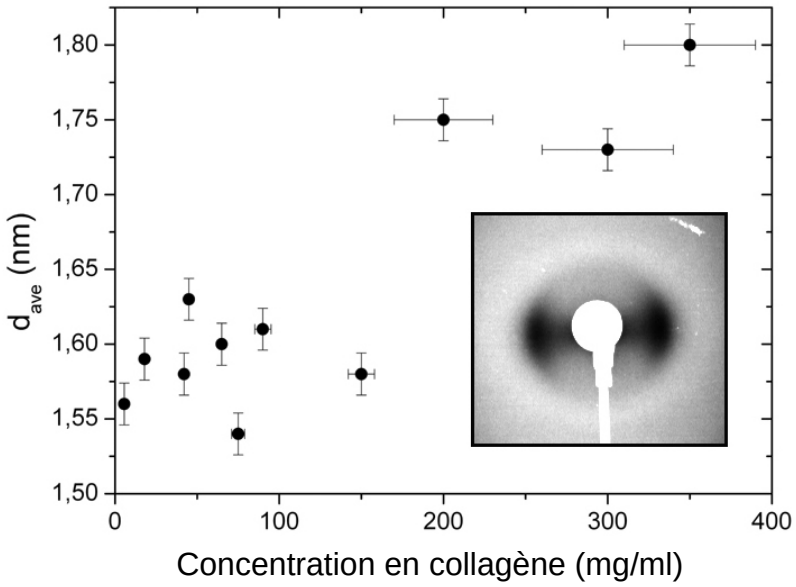


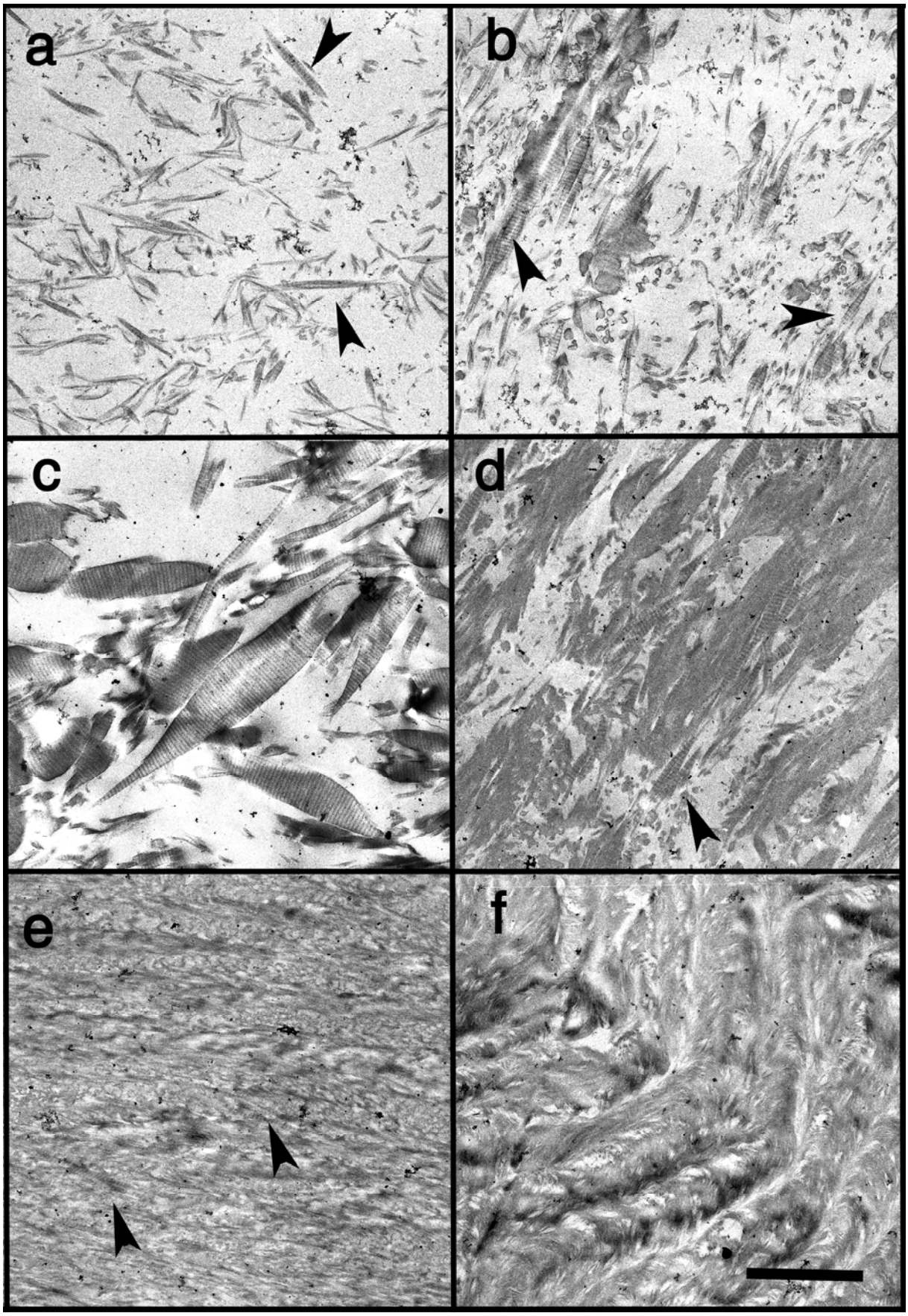
Figure 13 : Interdistance moléculaire intrafibrillaire moyenne d_{moy} en fonction de la concentration de la solution acide initiale. Cette distance est mesurée à partir du pic de corrélation d'ordre liquide latéral (insert).

Microscopie électronique à transmission – Pour cette étude, nous ne sommes pas descendus en dessous de 40 mg/ml, d'une part parce que le domaine des faibles concentrations est déjà largement étudié dans la littérature, et d'autre part parce que la préparation des échantillons (inclusions puis coupes) nécessite qu'ils soient suffisamment denses. Nous avons pu observer des morphologies relativement variées en fonction de la concentration, principalement en termes de taille de fibrilles.

i) Dans le domaine de concentration [40-80 mg/ml] (Figure 14a-b), les fibrilles sont petites et fines et réparties de façon relativement homogène. Leur rapport d'aspect est de l'ordre de 10 à 20. Leur diamètre augmente de 40-80 nm à 40 mg/ml jusqu'à 80-120 nm à 80 mg/ml. Par ailleurs, elles n'ont pas d'orientation particulière puisque dans ce domaine de concentration les solutions acides initiales sont encore isotropes.

ii) Nous observons une rupture à partir de 90 mg/ml (Figure 14c). Les fibrilles sont subitement beaucoup plus grosses. Tandis que leur rapport d'aspect n'est plus que de l'ordre de 4-5, elles peuvent atteindre jusqu'à 1,2 µm de large et 6 µm de long. En outre, nous observons aussi de plus gros objets digités (Figure 15) résultant de toute évidence de la rencontre de plusieurs fibrilles proches, ou de la bifurcation d'un objet unique initial. Enfin, nous pouvons définir un axe d'orientation préférentiel, hérité de l'alignement uniaxe de la phase nématique légèrement cisaillée lors de la préparation des échantillons.

iii) A partir de 200 mg/ml (Figure 14d-e), la phase observée devient pratiquement continue et la taille des fibrilles chute. Leur diamètre descend au-dessous de 100 nm et leur longueur n'est plus que de l'ordre du micron. Dans les échantillons les plus concentrés (au-delà de 300 mg/ml, Figure 14f), on peut parfois observer une structure périodique en arceaux évoquant une structure hélicoïdale telle que celles décrites par Y. Bouligand[101]. Ceci suggère que malgré les manipulations subies par les échantillons, leur élasticité est telle que la structure de la phase cholestérique a été conservée, au moins localement. Notons au passage que dans cette gamme de concentration « extrême », les structures observées sont beaucoup moins reproductibles que dans les gammes (i) et (ii), notamment du fait de la nature inhomogène des solutions acides avant la remontée de pH. Il nous semble que les structures observées dépendent aussi beaucoup de l'histoire mécanique de l'échantillon.



Voir légende page suivante.

Figure 14 : Influence de la concentration sur la structure microscopique des gels fibrillaires. Clichés de microscopie électronique de gels de concentrations croissantes **(a)** 40 mg/ml, **(b)** 75 mg/ml, **(c)** 100 mg/ml, **(d)** ~200 mg/ml, **(e)** >300 mg/ml **(f)** >> 300 mg/ml. Les flèches attirent l'attention sur les fibrilles striées. Barre d'échelle = 1,64 μm.

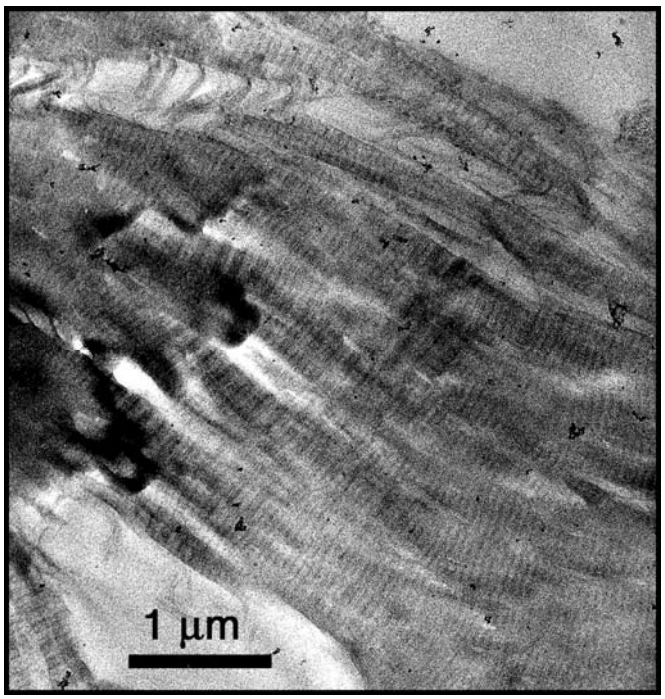


Figure 15 : Structure fibrillaire en « digitations », résultant de la rencontre de plusieurs fibrilles adjacentes pendant leur phase de croissance.

Discussion – Quand la fibrillogenèse est déclenchée *in vitro* dans des solutions de plus de ~1 mg/ml, que ce soit en remontant la température ou le pH, en réalité deux phénomènes concomitants ont lieu : l'agrégation de triples hélices de collagène en fibrilles organisées et la gélification du système, les fibrilles jouant le rôle de nœuds de réticulation.

La taille des fibrilles est donc très probablement contrôlée par l'équilibre entre le nombre de triples hélices de collagène disponibles dans le milieu et leur mobilité dans le gel en train de se former. Comme nous l'avons vu plus haut, le mécanisme probable de la fibrillogenèse *in vitro* implique la nucléation homogène de nanofibrilles suivie de leur croissance. À la lumière de la littérature déjà publiée et de nos résultats, nous avons constaté que la dépendance de la taille des fibrilles formées avec la concentration était fortement non monotone. Nous avons donc déterminé quatre domaines de concentrations correspondant à des régimes de formation différents, dont nous avons rapporté les principales caractéristiques dans le Tableau 2.

Dans le domaine dilué (< 5 mg/ml, Régime I), la période de latence correspondant à la phase de nucléation est d'autant plus courte que la concentration est élevée. En revanche, l'état final est caractérisé par une turbidité plus élevée et donc des fibrilles plus grosses, pouvant

atteindre jusqu'à plusieurs microns (voir les références 102 et 51 +Figure 16). Dans ce domaine, les gels formés sont peu résistants ; ils s'effondrent sur eux-mêmes et expulsent une partie du solvant (synérèse).

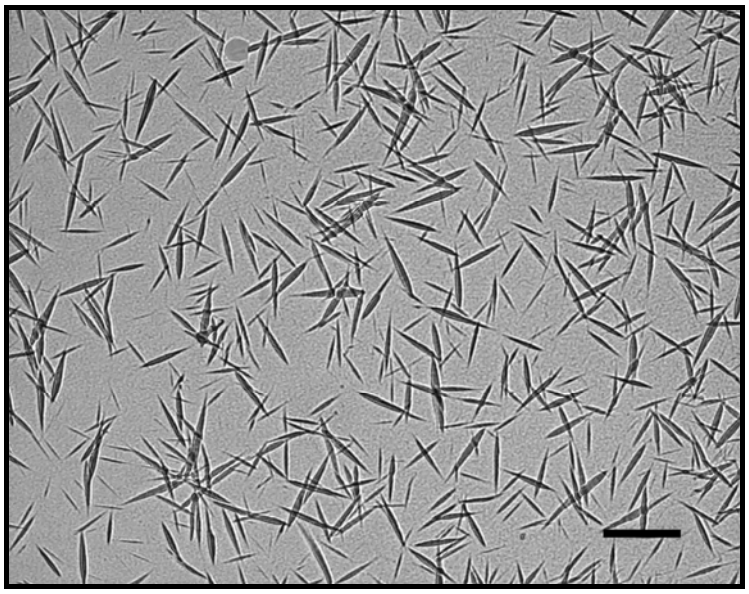


Figure 16 : Fibrilles de collagène formées à partir d'une solution à 5 mg/ml soumise à des vapeurs d'ammoniaque. Un gel lâche et translucide est obtenu. Microscopie optique, barre d'échelle = 10 μm.

Un deuxième domaine (de 10 mg/ml à 80 mg/ml, Régime II) est caractérisé par une taille de fibrilles plus petite. Dans des gels à 10 mg/ml, Silver *et coll.* décrivent des fibrilles dont le diamètre est de l'ordre 20-40 nm. Ici, nous avons observé des fibrilles un peu plus grandes : 40-80 nm à 40 mg/ml et 80-120 nm à 75 mg/ml. Ceci suggère que le taux de nucléation est plus important que dans le régime I, ce qui aboutit à un épuisement rapide du milieu en monomères (triples hélices) ou oligomères. La taille des fibrilles s'en trouve donc limitée bien qu'elle recommence à augmenter avec la concentration. Au niveau macroscopique, les gels possèdent une bien meilleure résistance à la traction et leur forme reste stable dans le temps.

Dans le troisième domaine étudié (90-150 mg/ml, Régime III), nous retrouvons des fibrilles de taille micrométrique. Le diamètre des fibrilles individuelles peut atteindre 1,2 microns et leur longueur 6 microns. Nous avons vu dans le chapitre précédent que dans cet intervalle de concentrations, les propriétés rhéologiques (G' ~ 200 Pa et G'' ~ 100 Pa pour $\omega = 0{,}1\ s^{-1}$, η ~ 300 Pa.s pour $\dot{\gamma} = 1\ s^{-1}$) étaient globalement constantes. Une explication possible à ce nouveau régime serait que la croissance des fibrilles est favorisée par l'augmentation de la concentration en triples hélices à mobilité moléculaire constante.

Enfin, dans l'ultime régime étudié (IV, à partir de 200 mg/ml), le diamètre des fibrilles rechute en dessous de 100 nm et reste pratiquement constant pour des concentrations au-delà de

300 mg/ml. Cette observation microscopique est cohérente avec les mesures de transmission de lumière sur les gels fibrillaires, puisque après avoir atteint un minimum vers 150 mg/ml – où les fibrilles étaient les plus grosses – la transmittance *T%* remonte légèrement.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de la dépendance de la taille des fibrilles formée en fonction de la concentration en collagène de la solution initiale.

Domaine de concentration	*Régime*	*Taille des fibrilles*	*Tendance*	*Comportement rhéologique*	*Références*
< 5 mg/ml	I	~micron	↗	*G*" > *G*'	Wood, Cassel
10-80 mg/ml	II	20 ⇒ 80 nm	↘	Augmentation très rapide des deux modules ; croisement	Christiansen, Pins, nos résultats
90-150 mg/ml	III	~micron	↗	*G*' > *G*" Plateau	nos résultats
200-300 mg/ml	IV	~100 nm	↘	*G*' > *G*"	nos résultats

Nous avons aussi observé que la concentration dans la solution acide initiale influence le degré de compaction des triples hélices dans les fibrilles. En effet, alors que le paramètre d_{moy} ne devrait pas varier avec la concentration, nous avons constaté que celui-ci augmente légèrement. Habituellement, de telles variations sont reliées à une modification de taux d'hydratation des fibrilles, notamment dans des expériences de gonflement de tendons[103] ou de réhydratation de films séchés.

Dans nos expériences, il est aussi possible que l'élasticité des solutions acides joue un rôle, notamment en réduisant la mobilité moléculaire des triples hélices. Par exemple, à 300 mg/ml nous avons mesuré un module de conservation (ou élastique) *G*' de 35 kPa et un module de perte *G*" de 20 kPa. Nous pourrions imaginer que la mobilité des triples hélices dans un tel milieu est très réduite et les empêche de s'assembler de façon suffisamment compacte. Néanmoins, cette explication ne semble pas compatible avec la formation spontanée de fibrilles en milieu acide très dense telle que rapportée dans la partie précédente. De plus, cette hypothétique élasticité microscopique ne semble pas affecter la périodicité axiale des fibrilles.

En revanche, nous n'avons pas mesuré de variation des longueurs de corrélation latérale et axiale avec la concentration. En effet, quand le diamètre des fibrilles augmente de ~80 nm à 75 mg/ml jusqu'à 1,2 µm à 145 mg/ml, la longueur de corrélation $\xi_{latéral}$ reste de l'ordre de 4-5 nm. L'ordre liquide local est donc limité aux 3-4 molécules voisines. Nous pouvons éventuellement relier cette valeur au diamètre des sous-unités (*microfibrilles*) de 4-5 triples hélices proposées par certains

auteurs pour rendre compte des premiers stades de nucléation de la fibrillogenèse *in vitro* et de la structure de la fibrille (voir § 4.1.1). Néanmoins, si cette valeur n'est pas contradictoire avec ce modèle, elle n'en constitue pas pour autant une preuve supplémentaire.

4.3.5 Influence du pH

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement concentrés sur la gamme de pH [6-13], où nous nous attendions à ce que la fibrillogenèse ait lieu. C'est aussi la gamme la plus large accessible avec des tampons phosphates. Nous avons élargi cette gamme aux pH plus acides (pH 4-5, dans de l'acide acétique), afin d'accéder à un domaine de moindre stabilité des fibrilles, mais sans contrôle particulier sur la force ionique. Aussi, la jonction de ces deux séries de données est délicate. L'influence du pH a été testée sur des concentrations allant de 40 à 140 mg/ml.

Observations optiques – Dans l'acide acétique, le collagène précipite à partir de pH 4,5 sous la forme d'un gel très lâche, qui se désagrège facilement. À pH 5, le gel obtenu est plus conforme à l'aspect d'un gel formé dans les conditions neutres ou basiques (par exemple dans du PBS) pour une concentration donnée. De façon surprenante, les gels formés dans un tampon phosphate à pH 6 sont beaucoup moins cohésifs. Ceci peut s'expliquer par une force ionique beaucoup plus faible dans le cas des solutions d'acide acétique et de la nature différente des contre ions.
Les solutions plongées dans des tampons phosphates de pH 7-12 deviennent des gels opaques ($T\% \sim 20 \pm 4\%$ à 80 mg/ml) et d'autant plus résistants que la concentration est élevée. En dehors de cette gamme, soit à pH ≤ 6 et à pH ≥ 13, les échantillons sont plus translucides ($T\% \sim 30 \pm 4\%$ à 80 mg/ml), même s'ils se comportent comme des gels et sont stables dans le temps.

Diffusion des rayons X – La position et la largeur à mi-hauteur du signal des réflexions aux petits angles correspondant à la période de 67 nm apparaissent insensibles au pH. Cependant, des variations systématiques de l'aire intégrée sous les pics sont observées avec des valeurs plus élevées dans le domaine de pH [7-11,4]. Dans l'acide acétique, nous avons pu observer un signal fibrillaire à pH 5. En revanche, au-dessous de pH 4,5, nous n'avons pas observé ce signal, sauf pour des concentrations supérieures à 160 mg/ml (Cf. § 4.3.3).
L'intensité intégrée sous le pic de corrélation latéral ($d_{moy} = 1,55 \pm 0,01$ nm à 75 mg/ml) décroît quand le pH est élevé au-dessus de 12,2. D'autre part, la position du pic est décalée vers des valeurs de q légèrement inférieures ($d_{moy} = 1,62 \pm 0,01$ nm à 75 mg/ml), ce qui indique que les molécules sont plus éloignées les unes des autres dans les fibrilles par rapport aux autres

conditions de pH. À pH 13, la position du faible maximum de corrélation latérale correspond à une distance moyenne d'environ 1,65 nm.

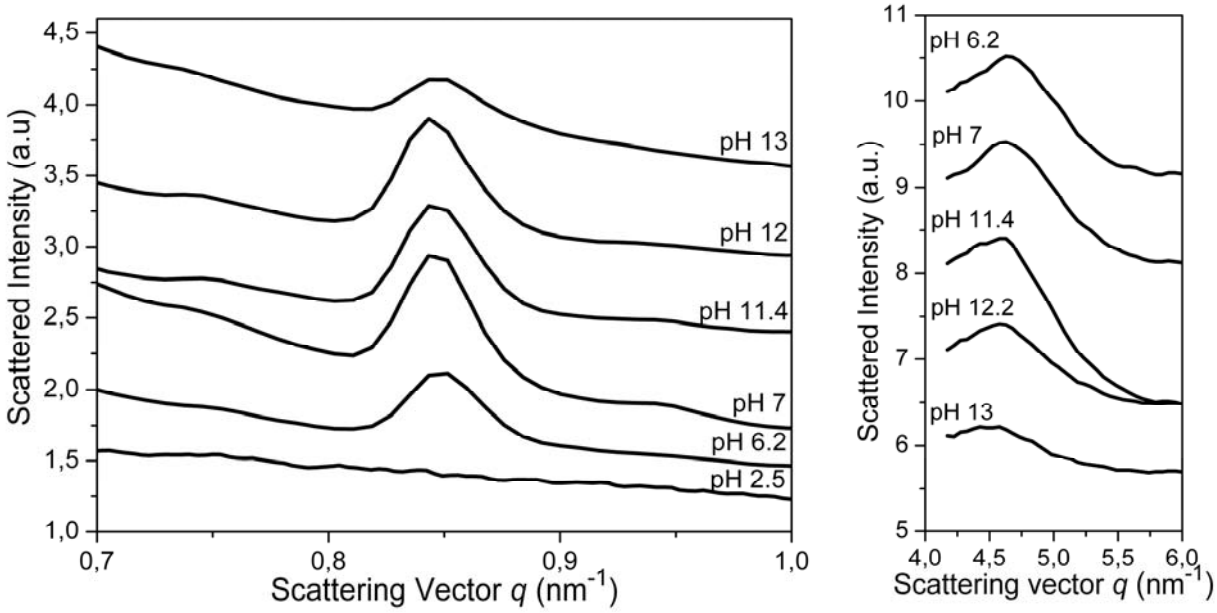


Figure 17 : Influence du pH du tampon de fibrillogenèse sur le signal de diffusion des rayons X. (a) 9ème ordre du signal périodique axial (petits angles) **(b)** Pic de corrélation latéral (grands angles). Echantillons à 75 mg/ml.

Microscopie électronique – Les fibrilles striées classiques sont communément observées dans un large domaine de pH (5-12,2), à des concentrations inférieures à 150 mg/ml. À une concentration donnée, la morphologie ne varie pas en fonction du pH. Il n'y a que dans les échantillons immergés dans le tampon à pH 13 que les structures diffèrent de façon significative. Si les agrégats observés peuvent toujours être qualifiés de « fibrillaires », ils sont qualitativement différents dans la mesure où les striations typiques de 67 nm sont très rarement observées. Ces agrégats ressemblent à des fagots de nanofibrilles de taille comparable aux fibrilles striées formées aux pH 5-12,2. Néanmoins, on rencontre aussi de gros amoncellements. Enfin, le champ est pratiquement totalement recouvert de petites nanofibrilles désordonnées d'environ 6 nm de diamètre.

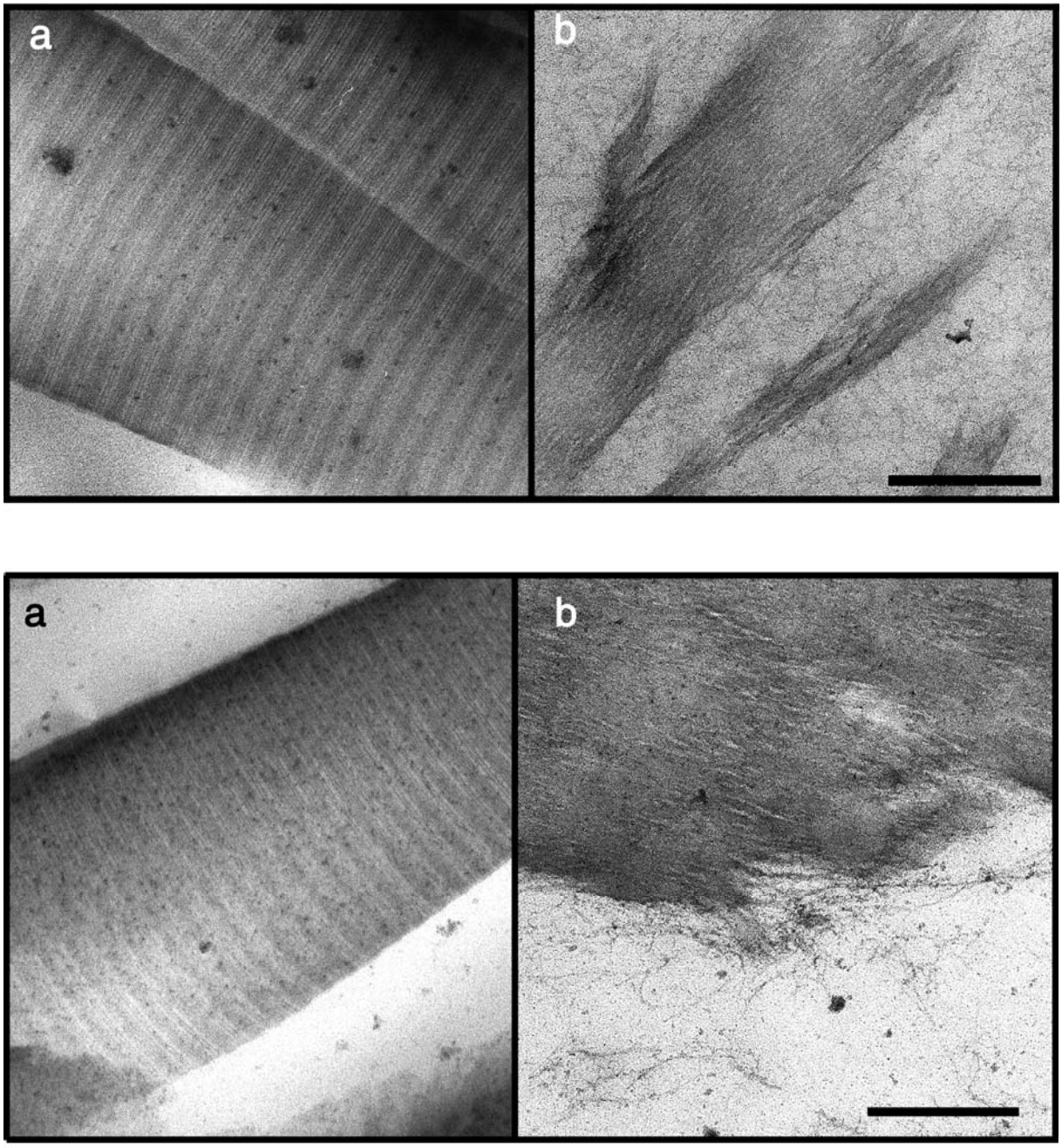


Figure 18 : Influence du pH sur la morphologie des fibrilles. Clichés de microscopie électronique à transmission de gels fibrillaires à 100 mg/ml (panneau haut) et 150 mg/ml (panneau bas) préparés dans des tampons à différents pH. **(a)** à pH 7,4 – comme à tout pH dans la gamme 5-12,2 – les fibrilles formées présentent la striation périodique classique de 67 nm **(b)** à pH 13, les objets observés apparaissent comme des fagots faiblement agrégés de nanofibrilles. Barre d'échelle = 266 nm.

Conclusion – La fibrillogenèse du collagène solubilisé en solution acide peut être facilement déclenchée en provoquant une remontée de pH. Ce phénomène est observé dès pH 5. Les fibrilles formées sont structuralement similaires à celles observées *in vivo* dans les tissus. Elles sont stables dans un large domaine de pH [5-12,2], autour du point isoélectrique de la molécule (~9) et charpentent des gels macroscopiques, sans influence notable du pH sur leur taille, leur morphologie et leur structure interne. Dans tous les cas, les striations périodiques sont observées en microscopie électronique ; de même, la compacité latérale (~1,6 nm) et le décalage axial périodique (~66,5 nm) restent constants. Ce décalage périodique est considéré comme étant fixé par des interactions électrostatiques spécifiques entre les acides aminés des triples hélices adjacentes. Les présents résultats nuancent l'importance de ces interactions spécifiques pour la stabilité des fibrilles. En effet, l'analyse de la séquence primaire d'acides aminés du collagène a montré l'importance des interactions électrostatiques sur la mise en place du décalage périodique des triples hélices à l'intérieur des fibrilles[11,104]. La stabilité des fibrilles devrait donc logiquement être fortement affectée par la modification de la charge nette porté par le collagène lors des variations de pH. Or, nous n'observons pas de réelle influence du pH sur la périodicité axiale ni sur la stabilité des fibrilles. Pourtant, bien que la charge de chacun des acides aminés ne change pas de signe, la charge nette de la molécule s'inverse vers pH 9.

Cependant, comme les gels sont préparés à partir de solutions initiales *acides* (pH 2,5), nous ne pouvons écarter l'hypothèse que les fibrilles soient formées pendant la remontée de pH, *avant même* d'avoir atteint le pH final. Dans ce cas, nos résultats donneraient essentiellement une indication sur la stabilité des fibrilles à un pH donné et montreraient qu'une fois que les fibrilles sont formées, il n'y a pas de réorganisation des molécules sous l'effet d'interaction électrostatique spécifiques. Néanmoins, il est beaucoup plus probable que les ions diffusent dans l'échantillon plus vite que les macromolécules elles-mêmes et que le pH s'équilibre dans un temps négligeable. Les cinétiques de fibrillogenèse typiquement rapportées dans la littérature, même en milieu très dilué ont des temps caractéristiques relativement longs (de l'ordre de l'heure) en comparaison de la diffusion de petits ions et de la neutralisation de l'acide acétique. Nous avons obtenu des indications convergentes au cours d'expériences récentes à l'ESRF (Cf. § 4.3.8).

Les forces électrostatiques à longue portée jouent indubitablement un rôle essentiel dans le passage d'un régime répulsif à un régime attractif, mais d'autres forces à courte portée telles que les interactions hydrophobes ou de van der Waals prennent certainement le relais pour assurer la stabilité des fibrilles.

À certains pH acides (4,5 dans l'acide acétique et 6,2 dans tampon phosphate), les triples hélices précipitent bien, mais forment des gels moins rigides qu'aux autres pH étudiés. Ces deux

conditions correspondent vraisemblablement à des zones de transition (de deux séquences de phases différentes) entre le régime attractif où les triples hélices s'assemblent en fibrilles et le régime répulsif où elles se solubilisent. En dessous de pH 4, et pour des concentrations inférieures à 160 mg/ml, le collagène est complètement soluble.

4.3.6 Influence de la force ionique

Observations optiques – Comme nous l'avons vu lors de la présentation du protocole de purification du collagène, l'addition d'un sel monovalent (en l'occurrence NaCl) à hauteur de 600 mM à une solution acide de collagène induit la précipitation désordonnée des triples hélices de collagène. On obtient alors une mixture flasque d'agrégats désordonnés.
Il en va tout autrement lorsque le pH de la solution tampon est neutre ou basique. A pH 7,4, lorsque la force ionique est supérieure à 127 mM, le tampon forme des gels solides et opaques, si la concentration en collagène est suffisante ($T\%$ = 18 ± 2% à 100 mg/ml). À la plus faible force ionique étudiée (24 mM), un gel plus lâche et translucide est obtenu. À 100 mg/ml, la transmittance est de 90 ± 3% à pH 7,4 et 24 mM, à comparer à 98 ± 4% pour la solution acide correspondante.

Diffusion des rayons X – À pH neutre, la périodicité axiale des fibrilles est globalement insensible à la force ionique. En moyenne, nous la mesurons à 66,5 ± 0,2 nm. En revanche l'intensité des réflexions augmente continûment avec la force ionique dans la séquence allant de 24 mM à 794 mM.
Contrairement au signal axial, la position du pic correspondant aux interactions latérales entre triples hélices varie avec la force ionique pour des concentrations en collagène supérieures à 75 mg/ml. À 200 mg/ml, l'interdistance moléculaire est la plus importante (d_{moy} ~ 1,8 nm) aux forces ioniques modérées (127-261 mM), puis décroît (d_{moy} ~ 1,6 nm) quand la force ionique est augmentée (500 mM) (Figure 20).

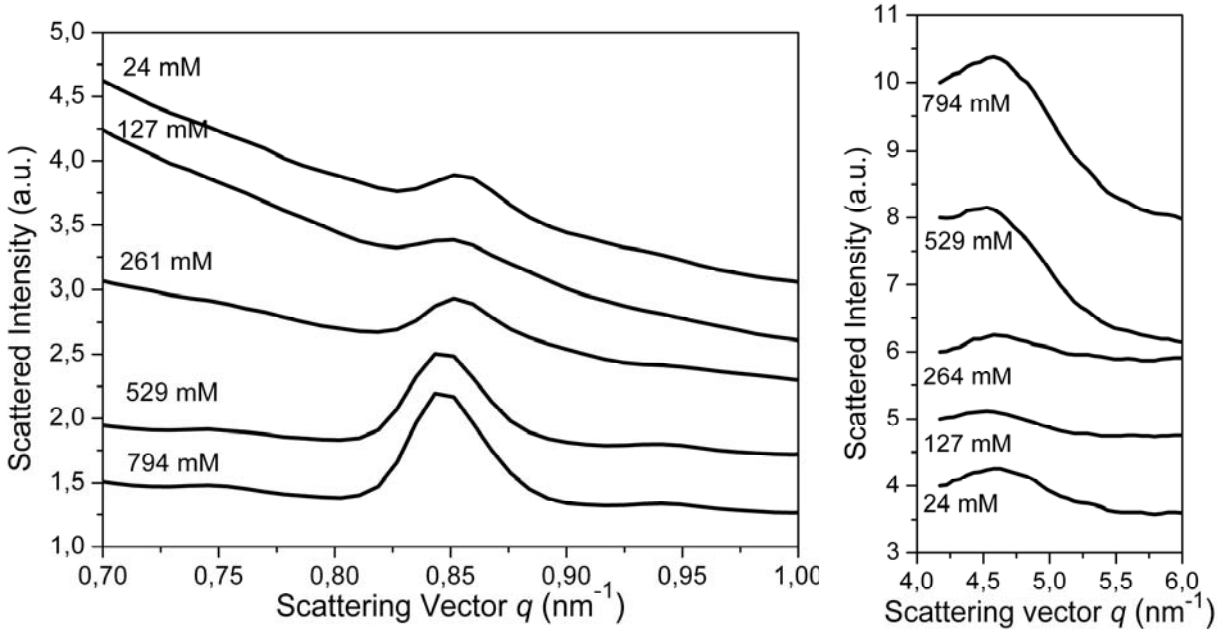


Figure 19 : Influence de la force ionique du tampon de fibrillogenèse sur le signal de diffusion des rayons X (à pH 7,4) (a) 9ème ordre du signal périodique axial (petits angles) **(b)** Pic de corrélation latéral (grands angles). Echantillons à 75 mg/ml.

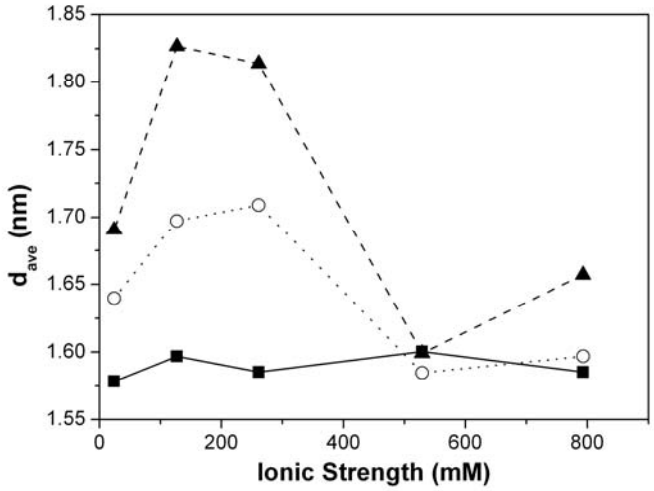


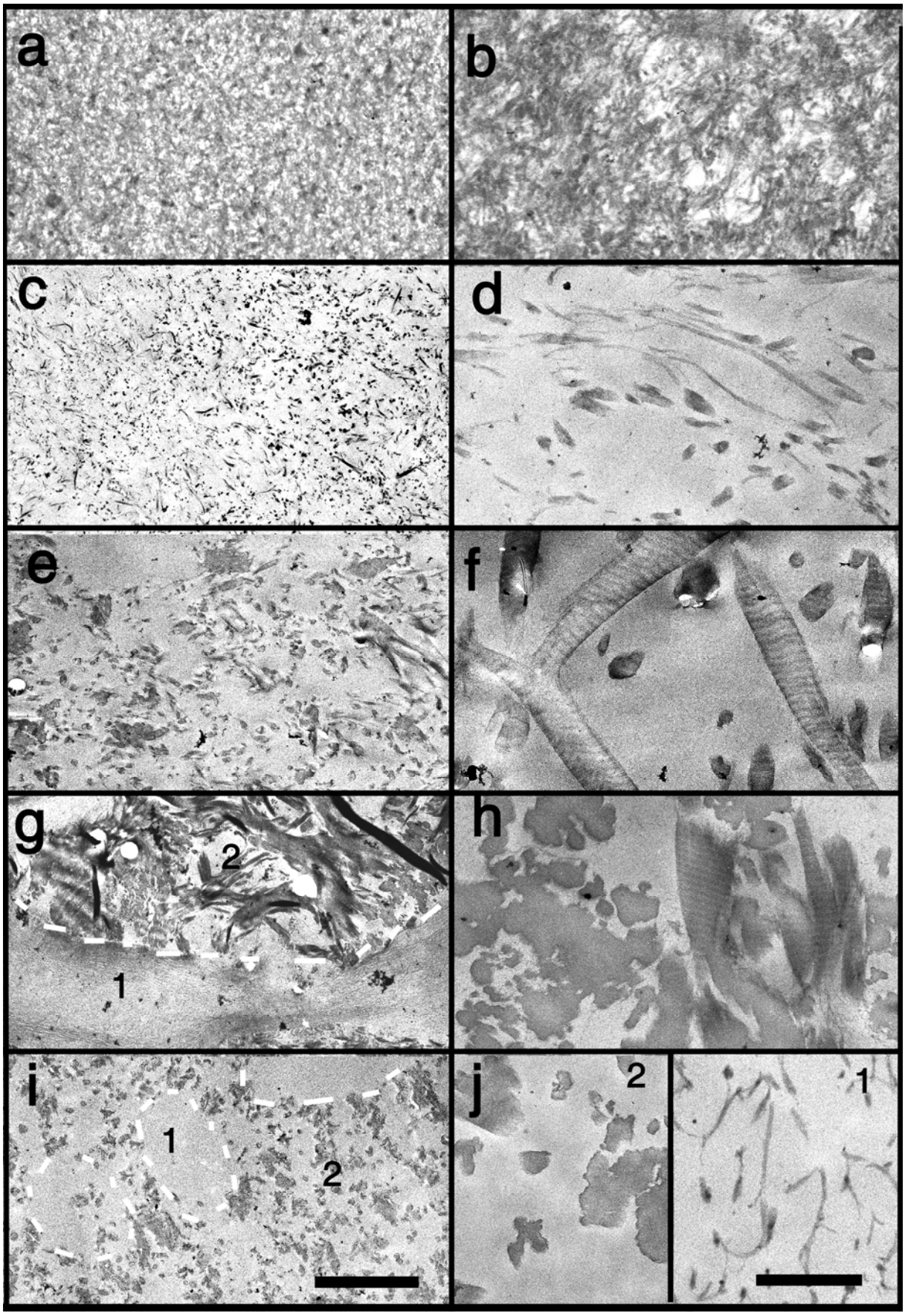
Figure 20 : Distance intermoléculaire moyenne en fonction de la force ionique du tampon de fibrillogenèse pour les concentrations suivantes 75 mg/ml (■), 145 mg/ml (○) et 200 mg/ml (▲).

Microscopie Electronique – Les observations en microscopie électronique ont été réalisées sur des échantillons de référence, sur la base de l'étude plus systématique effectuée par diffusion des rayons X. Ainsi, les échantillons à 100 mg/ml de collagène préparés dans un tampon à pH 7,4 ayant donné les signaux de diffusion les plus intenses, ce sont ceux pour lesquels nous pouvions espérer observer les tendances les plus nettes. Néanmoins d'autres observations complémentaires ont été réalisées à d'autres concentrations en collagène et ne seront mentionnées que si elles dévient de façon significative des tendances décrites.

À 24 mM, la plus faible force ionique testée dans notre étude, les fibrilles observées sont très limitées en taille et forment un réseau dense (Figure 21a-b). Nous avons estimé leur diamètre à 15-20 nm et leur longueur à 200-250 nm. La concentration en collagène ne modifie pratiquement pas ces dimensions ; en revanche, elle a un effet évident sur la densité du réseau fibrillaire, qui est dépendante de la quantité de triples hélices disponibles.

Pour la même concentration (100 mg/ml), et à une force ionique plus importante (124 mM), les fibrilles sont plus grandes (60-180 nm de diamètre et 1-2 µm de long, Figure 21c-d) et sont striées. À 261 mM, les fibrilles sont encore plus grandes (200-300 nm de diamètre et 3-4 µm de long, Figure 21e-f). À force ionique encore plus élevée (529 mM et 1300 mM), les fibrilles ne sont pas plus grandes mais sont souvent agrégées en fibrilles avec des diamètres de l'ordre de quelques microns (Figure 21g-j). On voit sur les coupes transverses que les fibrilles observées ont des sections non circulaires, irrégulières. En plus de ces gros agrégats de fibrilles, on observe aussi des nanofibrilles à peine plus grandes que celles observées à 24 mM. Leur diamètre est d'environ 40 nm et leur longueur d'environ 600 nm. Ces deux populations sont séparées en domaines. En outre, ces domaines sont organisés différemment à 529 mM qu'à 1300 mM. À 1300 mM, les domaines de nanofibrilles apparaissent dispersées entre les domaines de gros agrégats, tandis qu'à 529 mM les domaines sont bien séparés.

Des structures similaires sont observées quand la force ionique est fixée par l'ajout de chlorure de sodium (Cf. Tableau 1).



Légende page suivante.

Figure 21 : Influence de la force ionique *I* du tampon de fibrillogenèse sur la structure des gels (pH 7,4). Clichés de microscopie électronique de gel à 100 mg/ml. **(a-b)** *I* = 24 mM, **(c-d)** *I* = 124 mM, **(e-f)** *I* = 261 mM, **(g-h)** *I* = 594 mM, **(i-j)** *I* = 1300 mM. Colonne de gauche : faible grandissement, barre = 3 µm. Colonne de droite : fort grandissement, barre = 525 nm. "**1**" et "**2**" identifient les domaines contenant respectivement les petites fibrilles et les grandes fibrilles. Les frontières des domaines sont matérialisées par les traits pointillés blancs.

Conclusion – Il apparaît de nos résultats que la force ionique module les effets de la fibrillogenèse induite par remontée de pH. Un tampon de très faible force ionique (24 mM) a pour effet de fortement limiter la taille des fibrilles formées et la résistance mécanique du gel. Des observations similaires ont été faites en milieu très dilué par Cooper, qui décrit les gels formés en dessous de 100 mM comme étant « lâches et presque transparents comme de l'eau »[††], tandis que la microscopie électronique ne lui révèle que des « précipités amorphes avec seulement une faible indication de périodicité axiale »[‡‡]. De même, le signal que nous avons obtenu par diffusion des rayons X est plutôt faible par rapport à ceux obtenus à des forces ioniques plus élevées (127-261 mM), où les fibrilles observées sont plus larges et nettement striées. À des forces ioniques très élevées, les fibrilles sont agrégées entre elles, les objets formés sont donc d'autant plus gros. Encore une fois ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en régime très dilué. Gross&Kirk rapportent que la précipitation par remontée de température de solutions de 2,6 mg/ml de collagène forme des gels d'autant plus opaques que la force ionique est élevée entre 140 et 400 mM. Plus tard, Wood&Keech[105] ont montré dans des conditions similaires que les fibrilles étaient d'autant plus larges et s'agrégeaient en fagots. Au niveau moléculaire, les rayons X montrent que les triples hélices sont plus proches à l'intérieur des fibrilles. Ce phénomène d'agrégation peut s'interpréter simplement en termes de pression osmotique s'exerçant sur les fibrilles. Ainsi, Ripamonti *et al.*[106] ont montré qu'une force ionique élevée (0,5 M KCl) contribuait à réduire le désordre induit par le gonflement de tendons de queues de rat trempés dans différentes solutions.

Enfin, si nous n'avons pas directement observé l'augmentation de la solubilité des fibrilles avec la force ionique décrite par Cooper, elle pourrait être en relation avec la présence de nanofibrilles qui coexistent avec les agrégats à *I* = 529 mM et 1300 mM.

Nous avons aussi vu que, dans le domaine le plus élevé de force ionique à pH neutre, malgré une concentration en ions mobiles suffisante pour écranter les charges portées par les triples hélices, ces dernières précipitaient toujours de façon organisée. Ceci suggère une fois de plus que la fibrillogenèse *in vitro* n'est pas seulement gouvernée par les forces électrostatiques, mais aussi par des interactions hydrophobes et non ioniques, insensibles à la force ionique du milieu.

[††] « weak and almost water-clear »

[‡‡] « amorphous precipitates with only slight indications of band-interband periodicities »

4.3.8 Quelques remarques sur la cinétique

Cinétique à court terme – Les résultats que nous avons présentés résultent de la caractérisation d'états finaux et ils nous ont amené à émettre des hypothèses mécanistiques pour les interpréter. La fibrillogenèse étant un phénomène dynamique, il est évident qu'une étude cinétique croisée en diffusion des rayons X et en microscopie électronique nous apporterait beaucoup plus d'informations sur les mécanismes en milieu dense et permettrait de répondre aux questions que nous avons laissées en suspens. Malheureusement, la densité et le volume des solutions font obstacles à la réalisation de telles expériences. En effet, la fibrillogenèse débute nécessairement à une interface (air/collagène ou eau/collagène) avant de se propager dans le volume. Ceci signifie que deux phénomènes se produisent simultanément : la diffusion des ions neutralisant la solution acide et la fibrillogenèse proprement dite. Dans ces conditions, il n'est pas évident de prélever des échantillons homogènes pour l'observation en microscopie électronique en cours de processus.
Nous avons donc dû nous contenter de collecter quelques informations visuelles et de quelques tentatives malheureusement incomplètes de suivi cinétique en diffusion des rayons X.

Observations optiques – De ces observations visuelles et qualitatives, nous déduisons que la fibrillogenèse est un phénomène finalement assez lent et progressif. C'était déjà le cas en milieu dilué, où les courbes de croissance dans des conditions de référence (25°C ; 50 µg/l ; pH 7,1 ; I = 230 mM) atteignent un plateau au bout d'un temps qui est de l'ordre de l'heure. En milieu dense, la surface d'une solution concentrée au contact d'une solution neutre blanchit quasi instantanément, mais l'échantillon met plusieurs heures à devenir opaque de façon homogène dans tout le volume. De même, en présence de vapeurs d'ammoniaque, nous avons mesuré que la vitesse de diffusion de l'interface gel fibrillaire/solution acide à l'intérieur d'un capillaire de 2 mm de diamètre n'était que de 1 mm/heure. Cette vitesse est certainement inférieure à la diffusion des ions dans une solution et implique que les agrégats et fibrilles ne se forment pas instantanément. La seule façon d'éclaircir ce problème serait de disposer d'une petite molécule capable de se décomposer pour donner une base sous l'effet d'une radiation par exemple, et dont la présence ne modifierait pas trop le mécanisme de la fibrillogenèse. Nous n'avons malheureusement pas connaissance de l'existence d'un tel composé.

Diffusion des rayons X – Nous avons aussi entrepris un suivi de la progression de la fibrillogenèse par diffusion des rayons X pour différentes concentrations. Pour cela, nous avons aspiré les solutions acides à l'intérieur de capillaires de quartz de 2 mm de diamètre. Avant d'en sceller les extrémités, nous avons introduit une goutte d'ammoniaque à 30% dont les vapeurs, en se diffusant dans le capillaire, vont induire la fibrillogenèse des solutions acides.
À notre connaissance, seulement deux tentatives de suivi cinétique de la fibrillogenèse par rayonnement synchrotron sont représentées dans la littérature. La première date des travaux de Suarez *et coll.* en 1985, qui avaient observé l'augmentation de la diffusion en solution diluée en l'attribuant à la formation de sous-fibrilles. Plus récemment, une approche semblable a été tentée récemment à l'aide d'un montage de microfluidique[107], mais ces expériences n'ont pas permis pour l'instant d'apporter un éclairage nouveau sur les aspects cinétiques[§§].

Il ressort de nos expériences que la fibrillogenèse en milieu dense est un phénomène relativement lent, de l'ordre de la journée. En effet, si les solutions sont rapidement neutralisées et des agrégats se forment quasi instantanément comme l'atteste le blanchiment des solution, il semble que les triples hélices mettent au moins 24 heures à se mettre en décalage périodique. En revanche, nous n'avons pu mettre en évidence la formation d'intermédiaires dans les premières étapes de la fibrillogenèse. Il est en effet fort possible que ceux-ci ne produisent pas un signal de diffusion des rayons X suffisamment intense.

Cinétique à long terme (vieillissement des gels) – Nous avons prélevé et fixé des gels de collagène conservés pendant 48 heures, 7 jours, un mois et deux mois dans du PBS, dans le tampon à pH 13, le tampon à 24 mM et le tampon à 800 mM. L'observation des coupes en microscopie électronique montre que la structure des gels fibrillaires est stable au-delà de 48 heures et, surtout, qu'il n'y a pas de croissance ni de réorganisation notable des fibrilles. Celles-ci ne sont donc pas mobiles dans les gels et n'ont pas la possibilité de coalescer. Nous pouvons affirmer qu'au bout de 48 heures au plus toutes les triples hélices libres de collagènes sont immobilisées, soit au sein des fibrilles, soit dans les espaces interfibrillaires.

Réticulation – Rappelons aussi que notre protocole d'extraction ne comprend pas de traitement à la pepsine, qui a pour effet de couper les télopeptides des régions terminales non hélicoïdales, responsables de la formation de réticulations covalentes dans les fibrilles natives. Donc, même si nous ne l'avons pas spécifiquement mis en évidence ici, les gels fibrillaires de

§§ Le signal de diffusion à d_{Bragg} = 4,2 nm observé par cette équipe ne correspond à aucun signal caractéristique des fibrilles de collagène et l'interprétation donnée en est peu satisfaisante.

collagène ont très certainement une structure d'amas percolant[108] dans lequel interviennent des réticulations chimiques intermoléculaires. En effet, Suarez *et al.*[61] ont montré que la précipitation du collagène était totalement, ou partiellement, réversible thermiquement suivant que les fonctions aldéhydes du collagène ont été réduites ou non.

Nous avons d'ailleurs remarqué à de nombreuses reprises qu'il est souvent impossible de redissoudre complètement des gels fibrillaires denses ou de ressolubiliser des solutions de collagène complètement déshydratées dans de l'acide acétique. Il reste souvent un film flottant entre deux eaux.

4.4 Conclusion

Les présents travaux nous ont permis d'aborder l'influence de la concentration sur l'assemblage des triples hélices de collagène en un gel fibrillaire dense et relativement organisé. En effet, jusqu'ici les études *in vitro* ont essentiellement porté sur la fibrillogenèse à partir de solutions de collagène diluées (5 mg/ml et bien moins), qui conservent un comportement de fluide newtonien. Ici, la viscoélasticité des solutions denses ajoute un nouveau niveau de complexité. Résumons en quelques points les principales lignes de ce chapitre.

- La concentration en collagène des solutions acides initiales a un impact significatif sur la taille des fibrilles formées dans le gel, qui nous a amené à définir différents régimes. Nous pensons que ces régimes résultent de la compétitivité entre deux effets antagonistes de la concentration : la quantité de triples hélices disponibles dans le milieu et la viscoélasticité accrues due à la multiplication des enchevêtrements moléculaires dans les solutions denses. Ceci aurait pour effet de favoriser dans certains cas la nucléation de nanofibrilles au sein de la solution ou la croissance de ces dernières dans d'autres cas. (§ 4.3.4)
- La fibrillogenèse conserve l'organisation tridimensionnelle à longue portée de la phase liquide, qu'elle soit isotrope, nématique ou cholestérique. Cette propriété cruciale avait déjà été mise en évidence dans des travaux précédents[1,2]. Elle permet un contrôle de l'architecture de la phase gel, qui serait plus difficile à atteindre en partant de fibrilles déjà formées en milieu dilué. (§ 4.3.1)
- Il existe un large domaine de pH où des fibrilles de collagène striées sont formées et diffusent les rayons X en produisant des pics de Bragg avec de multiples harmoniques. Cette grande stabilité répond sans doute à une nécessité biologique imposée par la variété des pH auxquels peuvent être confrontés les tissus conjonctifs. (§ 4.3.5)

- L'augmentation de la force ionique conduit à l'agrégation des fibrilles en fibres ou agrégats de fibrilles, ce qui contribue à augmenter l'intensité des pics de diffusion, mais pas la longueur de corrélation ξ. (§ 4.3.6)
- Dans les fibrilles, les longueurs de corrélation axiale et latérale mesurées par diffusion des rayons X sont relativement faibles, respectivement 300-900 nm et 4-5 nm. (§ 5.3.1)
- En milieu très dense ($C > 200$ mg/ml), des fibrilles de collagène se forment spontanément à pH acide. Ceci pourrait s'apparenter à une transition N*/SmA. (§ 5.3.3)
- L'ensemble des résultats sur l'influence de la force ionique et du pH confirme que les interactions électrostatiques ne sont pas les seules mises en jeu. En effet, la modification du pH ou l'augmentation de la force ionique à des concentrations susceptibles d'écranter les charges ne modifient pas nettement la structure des fibrilles formées. Actuellement, tout ce que nous pouvons dire, c'est que les différentes forces (électrostatiques, hydrophobes…) interagissent de manière complexe, sans pouvoir déterminer précisément dans quels cas les unes l'emportent sur les autres. Notamment, il faudrait distinguer leurs portées respectives et identifier celles qui jouent un rôle spécifique dans la formation même des fibrilles (approche à longue distance puis mise en décalage périodique de 67 nm) et celles qui contribuent à la stabilité des fibrilles déjà formées. En effet, les forces mises en jeu ne sont pas forcément les mêmes.

Un aspect crucial auquel nous nous sommes relativement peu confrontés est la conservation à grande échelle de la structure hélicoïdale dans les gels. Du fait de la contrainte expérimentale qui exigeait de produire des monodomaines en alignant la phase cristal-liquide par cisaillement, nous avons perturbé l'organisation cholestérique. Nous avons ainsi pu obtenir en diffusion des rayons X des clichés suffisamment intenses et anisotropes. Nous savons par ailleurs que l'organisation hélicoïdale peut être conservée dans des gels formés à partir de solutions concentrées autour de 100 mg/ml[1,2]. Dans notre cas, nous n'avons observé des structures en arceaux que dans des gels formés à partir de solutions suffisamment concentrées (environ 300 mg/ml) dont l'élasticité empêche localement de dérouler l'hélice cholestérique par cisaillement.

Implications biologiques – La densité et le confinement sont des paramètres physiologiques cruciaux qui ont été jusqu'ici peu pris en compte par les études *in vitro*. En l'occurrence, la forte viscoélasticité rencontrée dans nos échantillons pourrait être comparable à celle des compartiments cellulaires dans lesquelles les fibrilles sont conçues *in vivo*. Or, nous avons vu que

ce paramètre pouvait influencer une caractéristique aussi cruciale que le diamètre des fibrilles. En revanche, la structure même des fibrilles semble relativement peu affectée par des variations de forces ioniques. Cette bonne stabilité répond sans doute à des besoins physiologiques et explique la polyvalence des fibrilles de collagène et leur quasi ubiquité dans les tissus des vertébrés. Notre système permet donc d'envisager de tester certaines hypothèses sur la mise en ordre de la structure de ces tissus, bien que les conditions physico-chimiques restent très éloignées de l'environnement extracellulaire.

Implication dans les sciences des matériaux – L'objectif de ce travail était aussi de donner quelques indications aux scientifiques des matériaux qui entreprendraient de concevoir des matériaux à base de collagène ou de molécules "*collagen-like*". Nous avons montré qu'en modifiant quelques paramètres simples (concentration, pH, force ionique), nous pouvions obtenir une grande variété de structures. Certes, ces structures ne sont pas aussi bien définies que celles observées *in vivo*, mais il existe encore d'autres paramètres à tester, comme par exemple l'ajout de molécules adjuvantes dont le rôle pourrait être de contrôler le diamètre des fibrilles. Nous pouvons notamment penser à des glycosaminoglycanes comme la décorine ou l'acide hyaluronique, ou encore à des collagènes d'autre type[109,110].

4.5 Perspectives

Le travail que nous avons rapporté dans ce chapitre nous a permis de mieux contrôler certains aspects de la synthèse de matrices denses. Du point de vue des matériaux, il serait nécessaire de caractériser la résistance mécanique des gels fibrillaires obtenus. Certaines différences sont suffisamment marquées pour être appréciées *de visu*, mais il nous manque des mesures quantitatives permettant une réelle comparaison aux substituts déjà existant. Notons que des études des propriétés de matrices de collagène en traction sont en cours dans l'équipe en collaboration avec le Laboratoire de Mécanique Physique (UMR 7052-Paris XII)[111].

En outre, ces matrices organiques doivent pouvoir être renforcées par l'adjonction d'une phase minérale qu'elles contribueraient en retour à structurer. Cette approche suscite des recherches très actives. Au sein de l'équipe, elle a été amorcée par David Eglin avec de la silice[112,113] et fait l'objet des tentatives de minéralisation par de l'apatite présentées dans le chapitre suivant.

Par ailleurs ces matrices de collagène sont déjà utilisées dans le cadre de tests d'adhésion cellulaire, avec des fibroblastes[114,115,116] et des ostéoblastes, à travers les travaux de Christophe Hélary et Sylvain Vigier. Une autre application envisageable des matrices denses de collagène

dans le domaine biomédical réside dans la formulation, pour la vectorisation médicamenteuse (ciblage/relargage contrôlé)[117].

Références du Chapitre 4

[1] Besseau, L. et Giraud-Guille, M.-M. "Stabilization of Fluid Cholesteric Phases of Collagen to Ordered Gelated Matrices" *J. Mol. Biol.* **251** (1995) 197-202

[2] Mosser G., Anglo A., Helary C., Bouligand Y., Giraud-Guille M.-M. "Dense Tissue-like Collagen Matrices Formed in Cell-free Conditions" *Matrix Biol.* **25** (2006) 3-13

[3] Leikina E, Mertts MV, Kuznetsova N, Leikin S. "Type I collagen is thermally unstable at body temperature" *Proc. Natl. Acad. Sc.i U.S.A.* **99**:3 1314-8 (2002)

[4] Persikov A. V. et Brodsky B. "Unstable molecules form stable tissues" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** 3 (2002) 1101–1103

[5] Parry D.A.D. "The Molecular and Fibrillar Structure of Collagen and its Relationship to the Mechanical Properties of Connective Tissue" *Biophysical Chemistry* **29** (1988) 195-209

[6] Berthod F., Germain L., Guignard R., Lethias C., Garrone R., Damour O., van der Rest M., Auger F.A. "Differential Expression of Collagens XII and XIV in Human Skin and in Reconstructed Skin" *J. Invest. Dermat.* **108** (1997) 737-742

[7] Hulmes D.J.S. "Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures" *J. Struct. Biol.* **137** (2002) 2-10

[8] Ramachandran G.N. & Kartha G. "Structure of Collagen" *Nature* **174** (1954) 269-270

[9] Bear R.S. "X-ray Diffraction Studies on Protein Fibers. I. The Large Fiber-Axis Period of Collagen" *J. Am. Chem. Soc.* **66** (1944) 1297-1305

[10] Hodge A.J. et Petruska J.A. "Recent Studies with the Electron Microscope on Ordered Aggregates of the Tropocollagen Macromolecules" in: Aspects of Protein Structure (ed. Ramachandran G.N.) Academic Press, New-York (1963) 289-300

[11] Hulmes D.J.S., Miller A., Parry D.A.D., Piez K.S, Woodhead-Galloway J. "Analysis of the Primary Structure of Collagen for the Origin of Molecular Packing" *J. Mol. Biol* **79** (1973) 137-148

[12] Chapman J.A., Tzaphlidou M., Meek K.M., Kadler K.E. "The Collagen Fibril – A Model System for Studying the Staining and Fixation of a Protein" *Electron Microsc. Rev.* **3** (1990) 143-182

[13] Chernoff E.A.G. et Chernoff D.A. "Atomic Force Microscope Images of Collagen Fibres" *J. Vac. Sci. Technol.* **A10** (1992) 596-599

[14] Baselt D., Revel J., Baldeschwieler "Subfibrillar Structure of Type I Collagen Observed by Atomic Force Microscopy" *Biophys J.* **65** (1993) 2644-2655

[15] Revenko I., Sommer F., Minh D.T., Garrone R., Franc J. "Atomic Force Microscopy Study of the Collagen Fibre Structure" *Biol. Cell.* **80** (1994) 67-69

[16] Gale M., Pollanen M.S., Markiewicz P., Goh M.C. "Sequential Assembly of Collagen Revealed by Atomic Force Microscopy" *Biophys. J.* **68** (1995) 2124-2128

[17] Venturoni M., Gutsmann T., Fantner G.E., Kindt J.H., Hansma P.K. "Investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy" *Biochemical and Biophysical Research Communication* **303** (2003) 508-513

[18] Bozec L., van der Heidjden G., Horton M."Collagen Fibrils: Nanoscale Ropes" *Biophys. J.* **92** (2007) 70-75

[19] Smith J.W. "Molecular Pattern in Native Collagen" *Nature (London)* **219** (1968) 157-158

[20] Miller A. et Parry D.A.D. "Structure and Packing of Microfibrils in Collagen" *J. Mol. Biol.* (1973) 441-447

[21] Piez K.A. et Trus B. "A New Model for Packing of Type-I Collagen Molecules in the Native Fibrils" **1**:10 (1981) *Bioscience Reports* 801-810

[22] Trelstad R.L., Hayashi K., Gross J. "Collagen Fibrillogenesis: Intermediate Aggregates and Suprafibrillar Order" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:11 (1976) 4027-4031

[23] Gelman R.A. et Piez K.A. "Collagen Fibril Formation *in Vitro* – A Quasi-elastic Light-Scattering Study of Early Stages" *J. Biol. Chem.* **255**:17 (1980) 8098-8102

[24] Silver F.H. "Type I Collagen Fibrillogenesis *in Vitro* – Additional Evidence for the Assembly Mechanism" *J. Biol. Chem.* **256**:10 (1981) 4973-4977

[25] Torchia D.A. et Vanderhart D.L. "^{13}C Magnetic Resonance Evidence for Anisotropic Molecular Motion in Collagen Fibrils" *J. Mol. Biol.* **104** (1976) 315-321

[26] Jelinski L.W., Sullivan C.E. et Torchia D.A. "^{2}H NMR Study of Molecular Motion in Collagen Fibrils" *Nature* **284** (1980) 531-534

[27] Torchia D.A., Hiyama Y., Sarkar S.E. et Sullivan C.E. "Multinuclear Magnetic Resonance Studies of Collagen Molecular Structure and Dynamics" *Biopolymers* **24** (1985) 65-75

[28] Wilkinson S.J. et Hukins D.W.L. "Determination of Collagen Fibril Structur and Orientation in Connective Tissues by X-ray Diffraction" *Radiation Physics and Chemistry* **56** (1999) 197-204

[29] Hulmes D.J.S. et Miller A. "Quasi-hexagonal Molecular Packing in Collagen Fibrils" *Nature* **282** (1979) 878-880

[30] Orgel J.P.R.O., Miller A., Irving T.C., Fischetti R.F., Hammersley A.P., Wess T.J. "The In Situ Supermolecular Structure of Type I Collagen" *Structure* **9** (2001) 1061-1069

[31] Bouligand Y. "Two Superposed Fibre Diagrams in X-ray Diffraction Patterns of Collagen Tendons" (non publié)

[32] Sadoc J.F. et Rivier N. "Boerdijk-Coxeter Helix and Biological Helices" *Eur. Phys. J. B* **12** (1999) 309-308

[33] Chen J.M., Kung C.E., Feairheller S.H., Brown E.M. "An Energetic Evaluation of a « Smith » Collagen Microfibril Model" *Journal of Protein Chemistry* **10**:5 (1991) 535-552

[34] Orgel J.P.O "Microfibrillar Structure of Type I Collagen In Situ" *Proc. Natl. Acad. USA.* (2006) **103**

[35] Canty E.G. et Kadler K.E. "Procollagen Trafficking, processing and Fibrillogenesis" *J. Cell. Science* **118** (2005) 1341-1353

[36] Porter K.R. et Pappas G.D. "Collagen Formation by Fibroblasts of the Chick Embryo Dermis" *J. Cell Biol.* **5** (1959) 153-165

[37] Canty E.G., Lu Y., Meadows R.S., Shaw M.K., Holmes D.F., Kadler K.E. "Coalignement of Plasma Membrane Channels and Protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon" **165** 4 (2004) 553-563

[38] Neville A.C. "The Need for a Constraining Layer in the Formation of Monodomains Helicoids in a Wide Range of Biological Structures" *Tissue & Cell* **20** (1988) 133-143

[39] Nageotte J. "Action des Sels Neutres sur la Formation du Caillot Artificiel de Collagène" *C. R. Soc. Biol.* (Paris) **96** (1927) 828

[40] Gross J. et Kirk D., "The Heat Precipitation of Collagen from Neutral Salt Solution: Some Rate-Regulating Factors", *J. Biol. Chem.* **233** (1958) 355-360

[41] Gross J., Highberger J.H., Schmitt F.O., "Extraction of Collagen from Connective Tissues by Neutral Salt Solutions" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41** (1955) 1

[42] Jackson D.S. et Fessler J.H., *Nature* **176** (1955) 69

[43] Fessler J.H. "Some Properties of Neutral-Salt Soluble Collagen. 2" *Biochem J.* **76** (1960) 463-471

[44] Cooper A. "Thermodynamic Studies of the Assembly *in vitro* of Native Collagen Fibrils" *Biochem. J.* **118** (1970) 355-365

[45] McPherson J.M., Wallace D.G., Sawamura S.J., Conti A., Condell R.A., Wade S., Piez K.A. "Collagen Fibrillogenesis *In Vitro*: A Characterization of Fibril Quality as a Function of Assembly Conditions" *Collagen Rel. Res.* **5** (1985) 119-135

[46] Leikin S., Rau D.C., Parsegian V.A. "Direct Measurement of Forces Between Self-assembled Proteins. Temperature-dependent Exponential Forces Between Collagen Triple Helices" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 276-280

[47] Falini G., Fermani S., Foresti E., Parma B., Rubini K., Sidoti M.C., Roveri N. "Films of Self-Assembled Purely Helical Type I Collagen Molecules" *J. Mat. Chem.* **14** (2004) 2297-2302

[48] Comper W.D. et Veis A.., "The Mechanism of Nucleation for in Vitro Collagen Fibrils Formation" *Biopolymers* **16** (1977) 2113-2131

[49] Fletcher G.C. "Dynamic Light Scattering from Collagen Solutions. I. Translational Diffusion Coefficient and Aggregation Effects" *Biopolymers* **15**:11 (1976) 2201-2217

[50] Thomas J.C. & Fletcher G.C. "Dynamic Light Scattering from Collagen Solutions. II. Photon Correlation Study of the Depolarized Light" *Biopolymers* **15**:11 (1976) 2201-2217

[51] Cassel J.C., Mandelkern L., Roberts, D.E. "The kinetics of the heat precipitation of collagen" *J. Amer. Leather Chem. Assoc.* **57** (1962) 556-575.

[52] Torbet J., Ronzière M.-C. "Magnetic Alignment of Collagen during Self-assembly" *Biochem. J.* **219** (1984) 1057-1059

[53] Cisneros D.A., Hung C., Franz C. M., Muller D. J., "Observing Growth Steps of Collagen Self-assembly by Time-lapse High-resolution Atomic Force Microscopy" *J. Struct. Biol.* **154** (2006) 232-235

[54] Djabourov M., Lechaire J.-P., Gaill F. "Structure and Rheology of Gelatin and Collagen Gels" *Biorheology* **30** (1993) 191-205

[55] Gelman R.A., Williams B.R., Piez K.A., "Collagen Fibril Formation. Evidence for a Multistep Process", *J. Biol. Chem.* **254** 1 (1979) 180-186

[56] Cf Réf de Kadler K.E. et Chapman J.A., "An Electron Microscope Study of the First-Formed Aggregates in Collagen Fibril Assembly *in Vitro*" *Ann. NYAS* **460** (1985) 456-460

[57] Trelstad R. L., Hayashi K., Gross J. "Collagen Fibrillogenesis: Intermediate Aggregates and Suprafibrillar Order" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976) 4027-4031

[58] Christiansen D.L., Huang E.K., Silver F.H. "Assembly of Type I Collagen : Fusion of Fibril Subunits and the Influence of Fibril Diameter on Mechanical Properties" *Matrix Biol.* **19** (2000) 409-420

[59] Silver F.H. "Type I Collagen Fibrillogenesis *in Vitro*: Additional Evidence for the Assembly Mechanism" *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 4973-4977

[60] Kadler K.E. "Assembly of Collagen Fibrils *de Novo* of the Type I pC-Collagen with Procollagen C-proteinase. Assay of Critical Concentration Demonstrates that Collagen Self-Assembly is a Classical Example of an Entropy-Driven Process" *J. Biol. Chem.* **262**:32 (1987) 15696-15701

[61] Suarez, G.; Oronsky, A. L.; Bordas, J.; Koch, M. H. J. "Synchrotron Radiation X-ray Scattering in the Early Stages of *in vitro* Collagen Fibril Formation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 4693-4696

[62] Silver F.H., Freeman J.W., Seehra G.P. "Collagen Self-Assembly and the Development of Tendon Mechanical Properties" *J. Biomech.* **36** (2003) 1529-1553

[63] Na G.C., Phillips L.J., Freire E.I. "*In Vitro* Collagen Fibril Assembly: Thermodynamic Studies" *Biochemistry* **28** (1989) 7153-7161

[64] Leikin S., Rau D.C., Parsegian V.A. "Temperature-favoured Assembly of Collagen is Driven by Hydrophilic not Hydrophobic Interactions" *Nat. Struct. Biol.* **2** 3 (1995) 205-210

[65] Helseth Jr. D.L. et Veis A. "Collagen Self-Assembly *in Vitro*: Differentiating Specific Telopeptide-Dpendent Interactions Using Selective Enzyme Modification and the Addition of Free Amino Telopeptides" *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 7118-7128

[66] Ricard-Blum S. et Ville G. "Collagen Cross-linking" *Int. J. Biochem.* **21** 11 (1989) 1185-1189

[67] Eyre D.R., Paz M.A., Gallop P.A. "Cross-Linking in Collagen and Elastin" *Annu. Rev. Biochem.* **53** 717-748

[68] Tanzer M.L. "Cross-Linking of Collagen" *Science* **190**:4086 (1973) 561-566

[69] Robins S.P., Shimokomaki M., Bailey A.J. "The Chemistry of Collagen Cross-Links: Age-related Changes in the Reducible Components of Intact Bovine Collagen Fibres" *Biochem J.* **131** (1973) 771-780

[70] Gross J., Highberger J.H., Schmitt F.O. "Collagen Structures Considered as States of Aggregation of a Kinetic Unit. The Tropocollagen Particle" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40** (1954) 679-688

[71] Hodge A.J. et Schmitt F.O. "Interaction Properties of Sonically Fragmented Collagen Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (1958) 318-424

[72] Paige M.F., Rainey J.K., Goh M.C. "Fibrous Long Spacing Collagen Ultrastructure Elucidated by Atomic Force Microscopy" *Biophys. J.* **74** (1998) 3211-3216

[73] Bruns R.R., Hulmes D.J.S., Therrien S.F., Gross J. "Procollagen Segment-Long-Spacing Crystallites: Their Role in Collagen Fibrillogenesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** 1 (1979) 313-317

[74] Glimcher M.J., Hodge A.J., Schmitt F.O. "Macromolecular Aggregation States in Relation to Mineralization : The Collagen-Hydroxyapatite System as Studied In Vitro" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **43** (1957) 860-867

[75] Doyle B.B., Hukins D.W., Hulmes D.J.S., Miller A., Woodhead-Galloway J. "Collagen Polymorphism: Its Origins in the Amino Acid Sequence" *J. Mol. Biol.* **91** (1975) 79-88

[76] Woodhead-Galloway "Structure of the Collagen Fibril: an Interpretation" in: Collagen in Health and Disease, chapitre 3 (1982) 28-48

[77] Glimcher M.J. "Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation" *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* **64** (2006) 223-283

[78] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. "Molecular Biology of The Cell" 4ème Edition, Garland Science (2002)

[79] Pins G.D., Christiansen D.L., Patel R., Silver F.H. "Self-assembly of collagen fibers: influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties" *Biophys. J.* **73** (1997) 2164-2172

[80] Parry D.A.D., Flint M.H., Gillard G.C., Craig A.S. "A Role for Glycosaminoglycans in the Development of Collagen Fibrils" *FEBS Letters* **149** (1982) 1-7

[81] Quantock A.J. et Meek K.M. "Axial Electron Density of Human Scleral Collagen – Location of Proteoglycans by X-Ray Diffraction" *Biophys. J.* **54** (1988) 159-164

[82] Tsuprun V. et Santi P. "Crystalline Arrays of Proteoglycanes and Collagen in the Tectorial Membrane" *Matrix Biol.* **15** (1996) 31-38

[83] Feitosa V.L.C., Reis F.P., Esquisatto M.A.M., Joazeiro P.P., Vidal B.C., Pimentel E.R. "Comparative ultrastructural analysis of different regions of two digital flexor of tendon of pigs" *Micron* **37** (2006) 518-525

[84] Scott J.E. "Proteoglycan-Fibrillar Collagen Interactions" *Biochem J.* **252** (1988) 313-323

[85] Birk D.E., Fitch J.M., Babiarz J.P., Doane K.J., Linsenmayer T.F. "Collagen Fibrillogenesis in Vitro: Interaction of Types I and V Collagen Regulates Fibril Diameter" *J. Cell Sci.* **95** (1990) 649-657

[86] Font B., Eichenberger D., Rosenberg L.M., van der Rest M. "Characterization of the Interactions of Type XII Collagen with Two Small Proteoglycans from Fetal Bovine Tendon, Decorin and Fibromodulin" *Matrix Biol.* **15** (1996) 341-348

[87] Font B., Aubert-Foucher E., Goldschmidt D., Eichenberger D., van der Rest M. "Binding of Collagen XIV with the Dermatan Sulfate Side Chain of Decorin" *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 25015-25018

[88] Miyahara M., Hayashi K., Berger J., Tanzawa K, Njieha F.K., Trelstad R.L., Prockop D.J. "Formation of Collagen Fibrils by Enzymic Cleavage of Precursors of Type I Collagen *In Vitro*" *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 9891-9898

[89] Kadler K.E., Hojima Y., Prockop D.J. "Assembly of Collagen Fibrils de Novo Cleavage of the Type I pC-Collagen with Procollagen C-Proteinase" *J. Biol. Chem.* **260** : 32 (1987) 15696-15701

[90] Hulmes D.J.S., Kadler K.E., Mould A.P., Hojima Y., Holmes D.F., Cummings C., Chapman J.A., Prockop D.J. "Pleomorphism in Type I collagen Fibrils Produced by Persistence of the Procollagen N-Propeptide" *J. Mol. Biol.* **210** (1989) 337-345

[91] Giraud-Guille M.-M. et Besseau L. "Banded patterns in liquid crystalline phases of type I collagen : relationship with crimp morphology in connective tissue architecture" *Connect. Tissue Res.* **37** (1997) 183-193

[92] Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. "Image Processing with ImageJ" *Biophotonics Int.* **11** (2004) 26-42

[93] Kuznetsova , Leikin S. "Does the Triple Helical Domain of Type I Collagen Encode Molecular Recognition and Fiber Assembly while Telopeptides Serve as Catalytic Domains ?" *J. Biol. Chem.* **274** 51 (1999) 36083-36088

[94] Ripamonti A., Roveri N., Braga D., Hulmes D.J.S., Miller A., Timmins P.A. "Effects of pH and Ionic Strength on the Structure of Collagen Fibrils" *Biopolymers* **19** (1980) 965-975

[95] Ronzière M.-C., Berthet-Colominas C., Herbage D. "Comparative Structural Studies of Reconstituted and Native Type I and Type II Collagen Fibrils by Low-Angle X-ray Diffraction" *Biochimica et Biophysica Acta* **916** (1987) 381-387

[96] Martin R. "Les Propriétés d'Assemblages Cristallins Liquides du Procollagène" Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (1999) p. 95

[97] Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen" *Biology of the Cell* **67** (1989) 97-101

[98] Hukins D.W.L. et Woodhead-Galloway J. "Collagen Fibrils as Examples of Smectic A Biological Fibres" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **41** (1977) 33-39

[99] Hukins D.W.L. et Woodhead-Galloway J. "Liquid-Crystal Model for the Organization of Molecules in Collagen Fibrils" *Biochemical Society Transactions* 572ème Meeting (1978) 238-239

[100] Dogic Z. et Fraden S. "Smectic Phase in a Colloidal Suspension of Semiflexible Virus Particles" *Phys. Rev. Lett.* **78**:12 (1997) 2417-2420

[101] Bouligand Y. "Twisted Fibrous Arrangements in Biological Materials And Cholesteric Mesophases" *Tissue & Cell* **4**:2 (1972) 189-217

[102] Wood G.C. "The Formation of Fibrils from Collagen Solutions 2. A Mechanism of Collagen-Fibril Formation" *Biochem J.* **75** (1960) 598-605

[103] Sasaki N., Shiwa S., Yagihara S., Hikichi K. "X-ray Diffraction Studies on the Structure of Hydrated Collagen" *Biopolymers* **22** (1983) 2539-2547

[104] Hofmann H., Fietzek P.P., Kühn K. "The Role of Polar and Hydrophobic Interactions for the Molecular Packing of Type I Collagen: A Three-dimensional Evaluation of the Amino Acid Sequence" *J. Mol. Biol.* **125**:2 (1978) 137-165

[105] Wood G.C. et Keech M.K. "The Formation of Fibrils from Collagen Solutions 1. The Effect of Experimental Conditions: Kinetic and Electron-Microscope Studies" *Biochem J.* **75** (1960) 588-596

[106] Ripamonti A., Roveri N., Braga D., Hulmes D.J.S., Miller A., Timmins P.A. "Effects of pH and Ionic Strength on the Structure of Collagen Fibrils" *Biopolymers* **19** (1980) 965-975

[107] Köster S., Leach J.B., Struth B., Pfohl T., Wong J.Y. "Visualization of Flow-Aligned Type I Collagen Self-Assembly in Tunable pH Gradients" *Langmuir* **23**:2 (2007) 357-359

[108] Forgacs G., Newman S.A., Obukhov S.P., Birk D.E. "Phase Transition and Morphogenesis in a Model Biological System" *Phys. Rev. Lett.* **67**:17 (1991) 2399-2402

[109] Birk D.E., Fitch J.M., Babiarz J.P., Doane K.J., Linsenmayer T.F. "Collagen Fibrillogenesis in vitro: Interaction of Types I and V Collagen Regulates Fibril Diameter" *J. Cell. Science* **95** (1990) 649-657

[110] Birk D.E. "Type V Collagen : Heterotropic I/V Collagen Interactions in the Regulation of Fibril Assembly" *Micron* **32** (2001) 223-237

[111] Takahashi-Iñiguez Y., Hélary C., Ramtani S., Geiger D., Giraud-Guille M.-M. "Unconfined Compression Behaviour of Dense Fibrillar Collagen Matrices Mimetic of Living Tissue" (en préparation)

[112] Eglin D., Mosser G., Giraud-Guille M.-M., Livage J., Coradin T. "Type I Collagen, a Versatile Liquid Crystal Biological Template for Silica Structuration From Nano- to Microscopic Scales" *Soft Matter* **1**:2 (2005) 129-131

[113] Eglin D., Coradin T., Giraud-Guille M.-M., Hélary C., Livage J. "Collagen-silica Hybrid Materials: Sodium Silicate and Sodium Chloride Effects on Type I Collagen Fibrillogenesis" *Biomedical Materials and Engineering* **15**:1-2 (2005) 43-50

[114] Besseau L., Coulomb B., Godeau G., Lebreton-Decoster C., Giraud-Guille M.-M. "Production of Ordered Collagen Matrices for Three Dimensionnal Cell Culture" *Biomaterials* **23** (2002) 27-36

[115] Hélary C., Ovtracht L., Coulomb B., Godeau G., Giraud-Guille M.-M. "Dense Fibrillar Collagen Matrices: A Model to Study Myofibroblast Behaviour During Wound Healing" *Biomaterials* **27**:25 (2006) 4443-4452

[116] Hélary C., Foucault-Bertaud A., Godeau G., Coulomb B., Giraud-Guille M.-M. "Fibroblast Populated Dense Collagen Matrices: Cell Migration, Cell Migration, Cell Density and Metalloproteinases Expression" *Biomaterials* **26**:13 (2005) 1533-1543

[117] De Paoli Lacerda S.H., Ingber B., Rosenzweig N. "Structure-release Rate Correlation in Gels Containing Fluorescent Drug Analog" *Biomaterials* **26** (2005) 7164-7172

Chapitre 5

Minéralisation de matrices denses et ordonnées de collagène

L'avance vers la perfection se fait par voie de minéralisation.
- Michel Leiris[*]

Parmi les tissus conjonctifs structurés par les fibrilles de collagène, certains sont en outre renforcés par la minéralisation de cristaux de phosphates de calcium dont la structure dérive de l'apatite stoechiométrique. Il s'agit des os, des dents et de certains cartilages. Ce processus de biominéralisation est très complexe et les mécanismes sont vraisemblablement différents suivant les tissus[1]. Aussi, la biominéralisation suscite de nombreuses études, tant du point de vue biologique (études *in vivo*) que du point de vue de la synthèse de matériaux bioinspirés (études *in vitro*). C'est essentiellement cette dernière approche que nous avons suivie, en collaboration avec N. Nassif (LCMCP). Partant de notre relativement bonne maîtrise de préparation de gels fibrillaires de collagène denses et ordonnés, nous avons cherché à y faire précipiter une phase minérale, afin d'étudier l'influence de la phase organique sur la nucléation et la croissance de la phase minérale. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre trois protocoles de minéralisation différents : l'immersion de la matrice dans un sérum physiologique sanguin artificiel, la double diffusion ionique et enfin la coprécipitation du collagène en solution et de l'hydroxyapatite. Et en effet, nous avons pu très récemment mettre en évidence un coalignement des deux phases par diffusion des rayons X comme il est décrit dans l'os.

[*] "Le signal de l'Arctique" (Le Point cardinal, 1927) ; repris dans "Mots sans mémoire" (Gallimard, 1969).

5.1 Contexte

5.1.1 Historique et relations à l'étude de la morphogenèse

Originellement, les travaux présentés dans les chapitres précédents ont été motivés par l'observation par Y. Bouligand[2,3] de structures en arceaux dans des coupes ultrafines de tissus biologiques, notamment d'os compact décalcifié (Figure 1a), et l'analogie avec les cristaux liquides cholestériques (Figure 2 et Figure 1e du Chapitre 2). Parmi les nombreux groupes qui se sont intéressés à la caractérisation structurale de l'os et à l'étude de sa formation, le groupe de S. Weiner au sein du Weizmann Institute of Science (Israël) a été particulièrement actif[4-6]. En repartant de la molécule et en montrant que le collagène forme spontanément une phase cholestérique, M.-M. Giraud-Guille[7] a confirmé l'intuition formulée par Y. Bouligand, selon laquelle le collagène pourrait posséder intrinsèquement les propriétés nécessaires pour s'auto-organiser à l'état liquide (Chapitre 2 : Transition isotrope/nématique). Plus tard[8], elle a montré que la structure hélicoïdale de ces solutions pouvait être conservée en un gel fibrillaire tridimensionnel semblable à la matrice organique des tissus observés par Y. Bouligand (Figure 1b + Chapitre 4 : Etude de la fibrillogenèse). Dans cette perspective, l'étape suivante était logiquement de tenter de minéraliser les gels denses ordonnés obtenus *in vitro*. Outre la satisfaction esthétique de « boucler la boucle », ce projet se justifie à la fois par la recherche de la compréhension des phénomènes de minéralisation *in vivo* et par l'intérêt médical que peut représenter la synthèse de tels matériaux biomimétiques.

Une bibliographie abondante est consacrée à la réalisation *in vitro* de composites collagène/minéral. Mais la plupart des études se limitent à la minéralisation de films de collagène ou de fibrilles isolées[9,10], donc sans conservation d'organisation au niveau suprafibrillaire. Il nous a donc semblé pertinent de consacrer du temps à une étude de faisabilité de la minéralisation de nos matrices tridimensionnelles de collagène. Sans surprise, nous avons buté sur de nombreux problèmes méthodologiques liés à la nature volumique des échantillons. Néanmoins, nous livrons des conclusions positives auxquelles nous sommes parvenus. Les résultats obtenus montrent que les méthodes mises en œuvre permettent de produire des matrices minéralisées mimant la phase et la structure de l'os pour la première fois.

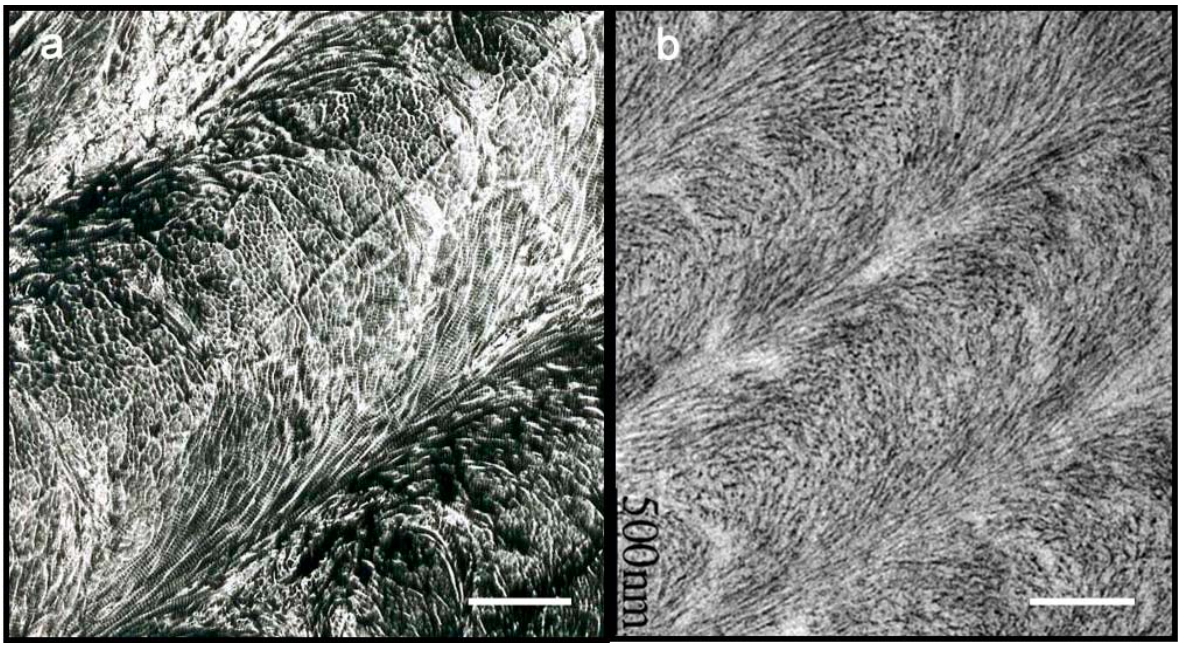


Figure 1 : Microscopie électronique à transmission. (a) Observation d'une coupe ultrafine d'os compact. Barre d'échelle = 2 µm **(b)** Phase cholestérique de collagène stabilisé in vitro par fibrillogenèse. Barre d'échelle = 500 nm. Dans les deux cas, les arceaux décrits par Y. Bouligand sont clairement visibles. Clichés tirés de Giraud-Guille (1998)[11]

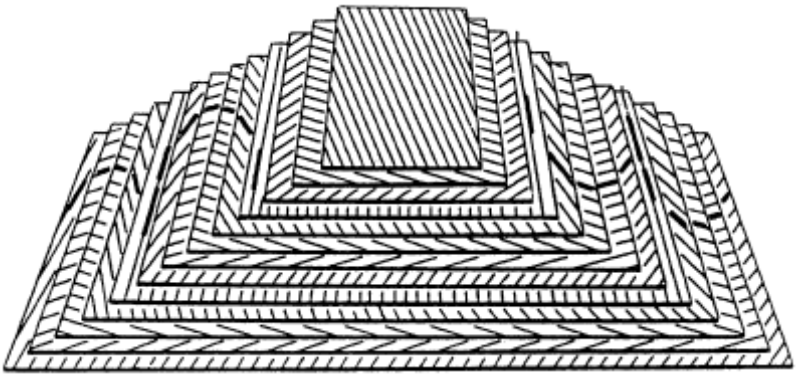


Figure 2 : Modèle du contreplaqué expliquant l'observation d'arceaux « cholestérique ». L'examen en transmission d'une coupe oblique d'un matériau ainsi structuré conduit à l'observation d'arceaux résultant de la projection des différentes directions d'orientation sur un même plan. Dessin : Giraud-Guille (1995).

5.1.2 Structures biologiques[12,†]

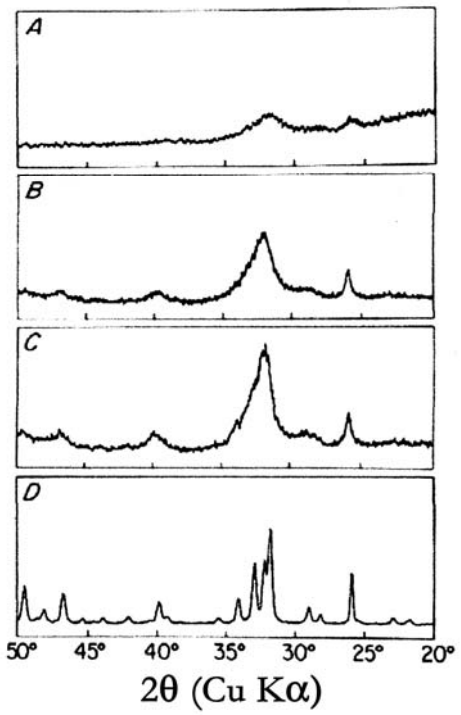
L'os en tant que tissu vivant – À ce stade, il est important de rappeler que ce que nous nommons « os » ne désigne pas un matériau inerte, mais un tissu vivant en perpétuel remodelage effectué par les cellules qui le constitue et alimenté par les vaisseaux sanguins qui le parcourent. Le constant renouvellement de cet organe complexe en rend la description compliquée. Par ailleurs, il faut distinguer l'os spongieux de l'os compact. Le premier possède une structure macroporeuse qui renferme des cellules sanguines, mésenchymateuses et des graisses. Le second présente une structure dense d'ostéones. Dans ces structures cylindriques organisées autour d'un canal central, le collagène forme des lamelles concentriques avec une rotation de l'axe des fibrilles d'une lamelle à l'autre[13].
En sus de leurs propriétés mécaniques qui répondent aux exigences des fonctions de locomotion (os longs des membres) et de protection des organes mous (crâne, cage thoracique), les os possèdent des propriétés physiologiques. En effet, ils remplissent le rôle de réservoirs d'ions qui maintiennent l'homéostasie des fluides extracellulaires.

Concernant la formation de l'os, il faut distinguer l'*ossification*, qui désigne la synthèse cellulaire spécifique d'une matrice organique spécifique par des cellules spécialisées appelées ostéoblastes, de la *minéralisation* proprement dite, qui se rapporte à la déposition d'une phase minérale au sein de la matrice organique déjà synthétisée. Les espèces ioniques sont apportées par le fluide extracellulaire qui imprègne la substance osseuse. Une fois les ostéoblastes entièrement pris dans la matrice minéralisée, leur activité cellulaire, structure et fonction changent ; ils se différencient en ostéocytes. Enfin, il faut mentionner les ostéoclastes, dont le rôle est de résorber le tissu minéralisé afin de permettre son remplacement. On estime ainsi que, chez l'homme, la totalité de la masse osseuse est renouvelée tous les 5-6 ans.

Nature du minéral – Il est accepté depuis longtemps que la phase minérale de l'os est constituée d'un phosphate de calcium de la famille de l'apatite[‡] ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). En revanche, sa structure et sa composition chimique exactes sont mal définies du fait notamment de son renouvellement permanent. En effet, la nature et le contenu des cristaux de phosphate de calcium dépendent fortement de l'échantillon choisi. Ainsi, un os jeune sera faiblement cristallin, tandis qu'avec l'âge, sa cristallinité et sa densité augmentent (Figure 3a-c). Pour autant, ses propriétés

† Pour plus de détails, nous renvoyons le lecteur à cette revue très complète de Glimcher (2006), dont nous nous sommes par ailleurs largement servis pour les rappels qui suivent.
‡ Du grec *apatân* « tromper », c'est-à-dire « pierre trompeuse, pseudo-précieuse ». Ce nom se justifie aussi à cause des difficultés rencontrées pour son identification…

restent très éloignées de celles des apatites géologiques et synthétiques (Figure 3d). En particulier, la taille et la forme des cristallites sont très spécifiques ; ceux-ci sont des petites plaquettes de 50 nm de long, 25 de large et 10 d'épais. Ainsi, dans les composites, le collagène est censé réguler la distribution des particules d'hydroxyapatite en les empêchant de s'agréger[14].



hkl	d (Å)	I
100	8.17	12
101	5.26	6
110	4.72	4
200	4.07	10
111	3.88	10
201	3.51	2
002	3.44	40
102	3.17	12
210	3.08	18
211	2.814	100
112	2.778	60
300	2.720	60
301	2.528	6
212	2.296	8
310	2.262	20
221	2.228	2
211	2.148	10
302	2.134	4
113	2.065	8
400	2.040	2
203	2.000	6
222	1.943	30
312	1.890	16
320	1.871	6
213	1.841	40
321	1.806	20
410	1.780	12
402	1.754	16
004	1.722	20

Figure 3 : Diffractogrammes de rayons X d'échantillons osseux de poulets âgés (a) de 17 jours, (b) de 5 semaines, **(c)** de deux ans, comparés à celui d'une hydroxyapatite synthétique hautement cristalline **(d)** Figure tirée de Glimcher 1996. **Tableau** : Données cristallographiques pour l'hydroxyapatite (Powder Diffraction File 9-432), tiré de Wenk et Heidelbach (1999)[15].

La formule de l'hydroxyapatite (HAP) est très largement modulée par des substitutions ou des lacunes, l'HAP non substituée n'existant pas dans les matériaux vivants sains[16]. Une substitution courante concerne le remplacement d'un ou plusieurs phosphates par des ions carbonates, conduisant à l'hydroxyapatite carbonatée de formule générique suivante : $Ca_{10}(CO_3,PO_4)_6(OH)_2$. Par ailleurs, les cations Na^+, K^+, Sr^{2+} sont souvent trouvés en substitution de Ca^{2+}, et les anions F^- ou Cl^- à la place d'OH^-. L'hydroxyapatite substituée (dahllite) est la phase principale trouvée dans les tissus vivants. L'hydroxyapatite est également la phase thermodynamiquement la plus stable, d'où sa très faible solubilité dans l'eau (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés des orthophosphates de calcium de pertinence biologique. Tiré de Dorozhkine *et al.* (2002).

Ca/P ratio	Compound	Formula	Solubility at 25 °C, $-\log(K_{sp})$	Solubility at 37 °C, $-\log(K_{sp})$	pH stability range in aqueous solution at 25 °C
0.5	monocalcium phosphate monohydrate (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	1.14	no data	0.0–2.0
0.5	monocalcium phosphate anhydrate (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	1.14	no data	[d]
1.0	dicalcium phosphate dihydrate (DCPD, "brushite")	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	6.59	6.63	2.0–6.0
1.0	dicalcium phosphate anhydrate (DCPA, "monetite")	$CaHPO_4$	6.90	7.02	[d]
1.33	octacalcium phosphate (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	96.6	95.9	5.5–7.0
1.5	α-tricalcium phosphate (α-TCP)	α-$Ca_3(PO_4)_2$	25.5	25.5	[b]
1.5	β-tricalcium phosphate (β-TCP)	β-$Ca_3(PO_4)_2$	28.9	29.5	[b]
1.2–2.2	amorphous calcium phosphate (ACP)	$Ca_x(PO_4)_y \cdot n H_2O$	[e]	[e]	[e]
1.5–1.67	calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ $(0<x<1)$	≈85.1	≈85.1	6.5–9.5
1.67	hydroxyapatite (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	116.8	117.2	9.5–12
2.0	tetracalcium phosphate (TTCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	38–44	37–42	[b]

[a] The solubility is given as the logarithm of the ion product of the given formulae (excluding hydrate water) with concentrations in mol L^{-1}. [b] These compounds cannot be precipitated from aqueous solutions. [c] Cannot be measured precisely. However, the following values were reported: 25.7 ± 0.1 (pH 7.40), 29.9 ± 0.1 (pH 6.00), 32.7 ± 0.1 (pH 5.28).[78] [d] Stable at temperatures above 100 °C. [e] Always metastable. The composition of a precipitate depends on the solution pH value and composition.

Il existe de nombreuses autres formes de phosphates de calcium dont les caractéristiques cristallographiques sont résumées dans le Tableau 2 ci-dessous. Certains de ces phosphates de calcium, dont DCPD (brushite), DCPA, OCP, β-TCP et ACP sont parfois trouvés dans les tissus vivants dans des conditions normales ou pathologiques. Nombre des orthophosphates de calcium sont obtenus spontanément lors de la précipitation *in vitro*, selon le pH de synthèse, la température, etc., et peuvent être des intermédiaires cinétiques de la synthèse d'apatite *in vitro*. Une difficulté majeure dans la préparation de matériaux minéralisés est de déterminer les conditions physico-chimiques qui favoriseront la formation d'une phase spécifique de phosphate de calcium, ici l'hydroxyapatite, dans des temps de réaction raisonnables et surtout compatibles avec la présence d'une phase organique. Évidemment, la présence d'une composante organique, dans notre cas le collagène, peut modifier des conditions déterminées en son absence.

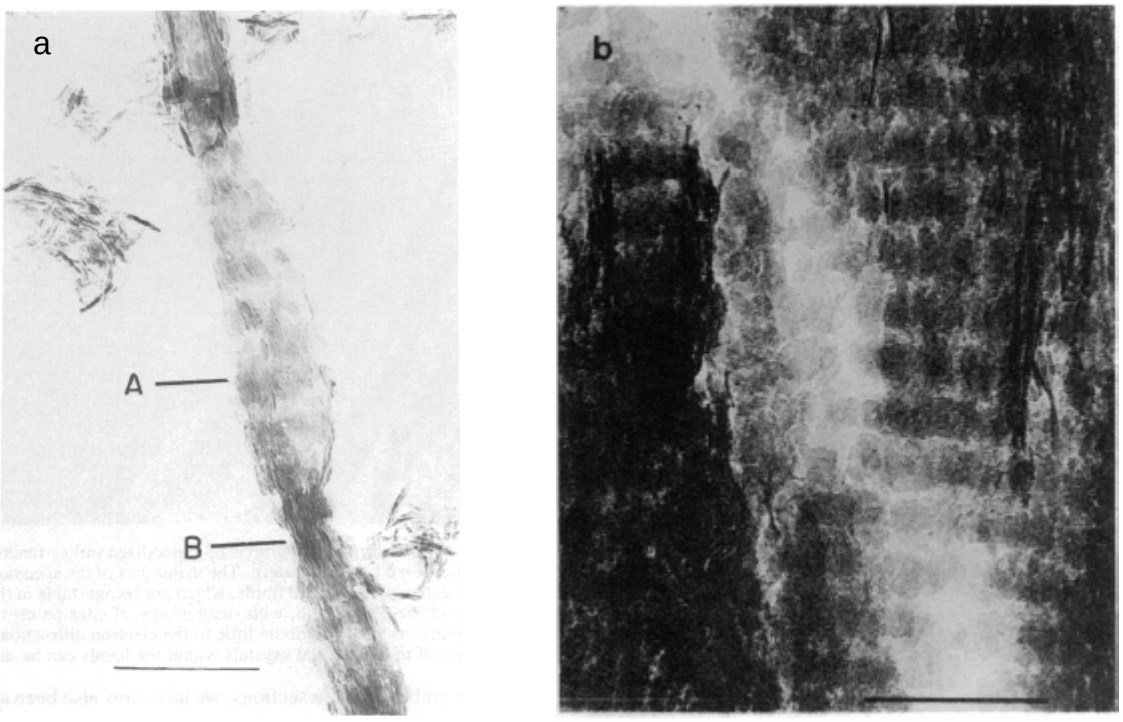
Tableau 2 : Données cristallographiques des phosphates de calcium. Tiré de Dorozhkine *et al.* (2002).

Compound	Space group	Unit cell parameters[a]	Z[b]	Density [g cm^{-3}]
MCPM	triclinic $P\bar{1}$	$a = 5.6261(5)$, $b = 11.889(2)$, $c = 6.4731(8)$ $\alpha = 98.633(6)$, $\beta = 118.262(6)$, $\gamma = 83.344(6)$	2	2.23
MCPA	triclinic $P\bar{1}$	$a = 7.5577(5)$, $b = 8.2531(6)$, $c = 5.5504(3)$ $\alpha = 109.87(1)$, $\beta = 93.68(1)$, $\gamma = 109.15(1)$	2	2.58
DCPD	monoclinic Ia	$a = 5.812(2)$, $b = 15.180(3)$, $c = 6.239(2)$ $\beta = 116.42(3)$	4	2.32
DCPA	triclinic $P\bar{1}$	$a = 6.910(1)$, $b = 6.627(2)$, $c = 6.998(2)$ $\alpha = 96.34(2)$, $\beta = 103.82(2)$, $\gamma = 88.33(2)$	4	2.89
OCP	triclinic $P\bar{1}$	$a = 19.692(4)$, $b = 9.523(2)$, $c = 6.835(2)$ $\alpha = 90.15(2)$, $\beta = 92.54(2)$, $\gamma = 108.65(1)$	1	2.61
α-TCP	monoclinic $P2_1/a$	$a = 12.887(2)$, $b = 27.280(4)$, $c = 15.219(2)$ $\beta = 126.20(1)$	24	2.86
β-TCP	rhombohedral $R3cH$	$a = b = 10.439(1)$, $c = 37.375(6)$ $\gamma = 120$	21[c]	3.07
HA	monoclinic $P2_1/b$	$a = 9.84214(8)$, $b = 2a$, $c = 6.8814(7)$ $\gamma = 120$ (monoclinic)	4	3.16
	or hexagonal $P6_3/m$	$a = b = 9.4302(5)$, $c = 6.8911(2)$ $\gamma = 120$ (hexagonal)	2	
TTCP	monoclinic $P2_1$	$a = 7.023(1)$, $b = 11.986(4)$, $c = 9.473(2)$ $\beta = 90.90(1)$	4	3.05

[a] a, b, c are given in Å and α, β, γ in °. [b] Number of formula units per unit cell. [c] Per hexagonal unit cell.

Interaction collagène-minéral – Nous avons vu que le collagène, principal élément de la matrice extracellulaire de l'os servait de support à la phase minérale. Aussi, le modèle de croissance le plus généralement invoqué fait intervenir la nucléation de l'apatite dans les fibrilles de collagène, plus précisément dans les *gaps*[17,18]. La croissance ultérieure des premiers germes cristallins dans les zones vides des fibrilles conduit à la formation des plaquettes décrites plus haut, qui croissent préférentiellement le long de l'axe cristallographique *c*, parallèlement les unes aux autres et à l'axe de la fibrille qui les supporte ; néanmoins, il n'est toujours pas exclu que la nucléation du minéral puisse avoir lieu à la surface des fibrilles[19].

Comme il est difficile d'observer de l'os compact minéralisé directement par microscopie électronique, beaucoup d'études ont été réalisées sur un système modèle qui est celui de tendons naturellement minéralisés. Outre les difficultés pour obtenir des sections fines de l'os, l'organisation hélicoïdale du composite collagène/apatite dans l'os rend difficile l'étude des relations cristallographiques qui peuvent exister entre les deux composantes. Par le biais des tendons minéralisés, il a été possible de démontrer la relation privilégiée qui existe entre l'orientation des fibrilles de collagène, et celle des cristaux d'apatite. Le groupe de S. Weiner a ainsi montré cette relation, en combinant des observations en microscopie électronique (Figure 4) et diffraction électronique sur aire sélectionnée (Figure 5).



Légende page suivante.

Figure 4 (page précédente) : Observation de tendons de dinde minéralisée en microscopie électronique à transmission. **(a)** Tendon minéralisé torsadé dans de la glace vitreuse montrant différentes largeurs vues perpendiculairement (A) ou parallèlement (B) aux plans des cristallites. Barre = 0,2 µm. **(b)** Section ultrafine près de la jonction entre deux fibrilles dans laquelle on peut discerner des cristaux plats à l'intérieur des bandes. Barre = 0,2 µm.

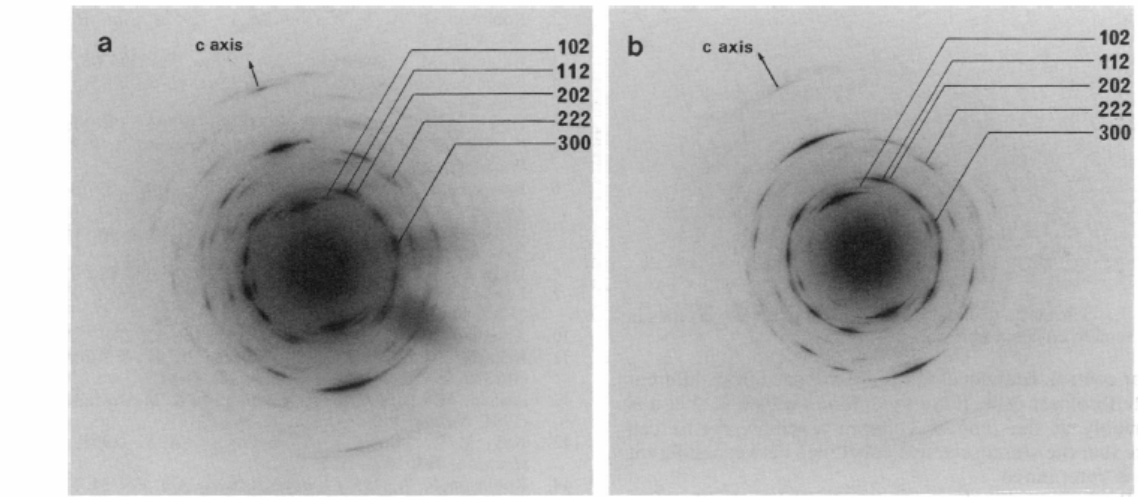


Figure 5 : Clichés de diffraction électronique de sections longitudinales de tendon de dinde minéralisés. **(a)** Diffraction d'une aire sélectionnée de 0,3 µm de diamètre. Ce cliché montre que les réflexions *h0l* (300, 102 et 202) sont relativement plus intenses que les réflexions *hhl* (112, 222) ce qui indique une orientation bien définie de l'axe *b* des cristallites d'apatite avec le faisceau d'électrons **(b)** Diffraction d'une aire sélectionnée de 0,9 µm de diamètre. Ce cliché montre les réflexions de types *hhl*, dont les 112 et 222, relativement plus intenses que les réflexions *h0l*. Ceci indique une orientation quasi uniforme de l'orientation des cristallites avec leurs facettes 110 perpendiculaires au faisceau incident avec leur axe *c* penché d'environ 30° par rapport au cliché (a).

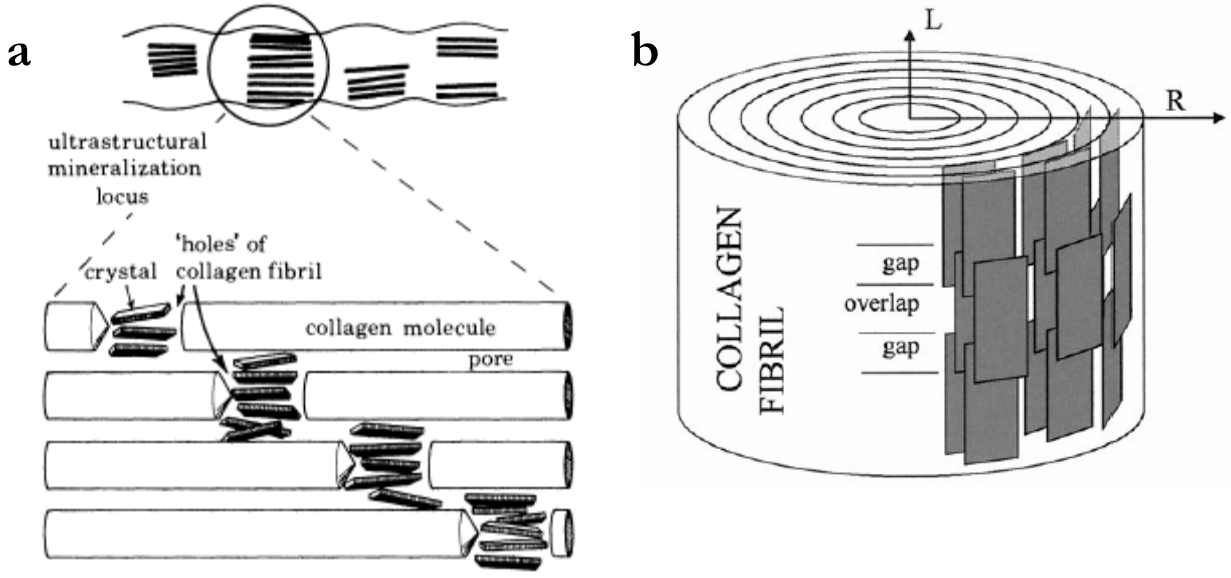


Figure 6 : Visions schématiques de l'orientation des plaquettes d'apatite au sein d'une fibrille de collagène. (a) Modèle de nucléation dans les gaps. Tiré de Glimcher (1984)[20]. **(b)** Tiré de Jäger *et al.* (2000)[21]

L'utilisation du rayonnement synchrotron a permis également d'approcher le problème en utilisant des microfaisceaux de très faible diamètre, typiquement 0,5 à 10 μm[15,22]. On peut ainsi sonder les textures cristallographiques de la phase minérale, c'est-à-dire les variations d'orientation préférentielle des cristallites à très petite échelle, de l'ordre de grandeur de celle du pas hélicoïdale de la structure osseuse. Néanmoins, ces travaux s'attachent à étudier les variations d'orientation de la phase minérale en faisant l'hypothèse de sa corrélation avec la phase organique. Il faut signaler également que Bigi *et al.*[23] ont étudié avec la même technique l'organisation des phases organique et minérale des écailles de poisson téléostéen. Ils ont ainsi révélé des co-alignements dans certaines zones particulière de l'écaille, où les deux signaux SAXS (67-nm collagène) et WAXS (apatite) enregistrés simultanément présentent des renforcements dans les mêmes directions.

5.1.3. Expériences de (re-)minéralisation *in vitro*

Des tentatives de minéralisation de collagène ont été entreprises depuis les années 50 environ[17,18,24], soit sur des fibrilles de collagène extraites de tissus, soit avec des matériaux préparés *in vitro*, qu'il s'agisse d'éponges[25] ou de fibrilles précipitées[26,27]. Les références citées ici pour la précipitation d'apatite au sein de matrices de collagène ne sont que des exemples parmi de nombreux travaux similaires.

5.2 Synthèses et caractérisations

Le caractère initiateur de ce chapitre nous a conduit à tester un grand nombre de conditions expérimentales et à préparer un grand nombre d'échantillons dont la caractérisation est encore en cours. La méthode la plus rapide pour cribler nos échantillons est une fois de plus la diffusion/diffraction des rayons X, en combinant la détection aux grands et aux petits angles. Une fois que nous avons été capables de détecter une phase minérale, nous avons cherché à caractériser deux aspects principaux : d'une part un éventuel coalignement des phases organique et minérale, et d'autre part l'identité de cette dernière. Enfin, nous avons cherché à dégager quelques critères cinétiques. Concernant la caractérisation par microscopie électronique, nous y consacrerons un paragraphe particulier.

Notons enfin que toutes ces méthodes ont préalablement été testées sans matrice organique afin d'optimiser les conditions d'obtention de l'apatite, dans le cadre d'un stage de Master 1 effectué par F. Martinot[28] (avril-juin 2006), sous la direction de N. Nassif.

5.2.1 Références

Nous nous sommes servi d'échantillons prélevés sur un fémur de veau comme références (Figure 7). Des bris ont été recueillis dans l'épiphyse (os spongieux) et dans la diaphyse (os compact). Nous avons aussi procédé à la déminéralisation de certains échantillons en les plongeant dans de l'EDTA 0,15 M (Ethylène Diamine Tétra-Acétique), qui a pour effet de chélater les ions calcium Ca^{2+}[29]. La disparition de la phase minérale met à jour un pic de structure du collagène situé à s = 3,41 nm^{-1}, que nous attribuons à l'interdistance entre deux résidus le long de la triple hélice de collagène, donnée pour égale à 2,86 Å[30] (voir notamment la figure 1 du chapitre 1). Ici, nous mesurons $d = 1/s$ = 2,93 Å. L'existence de ce pic est gênante car il pourrait facilement être confondu avec la réflexion 211 de l'apatite (la plus intense) (d_{211} = 2,814 Å), notamment lorsque la phase minérale est très minoritaire.

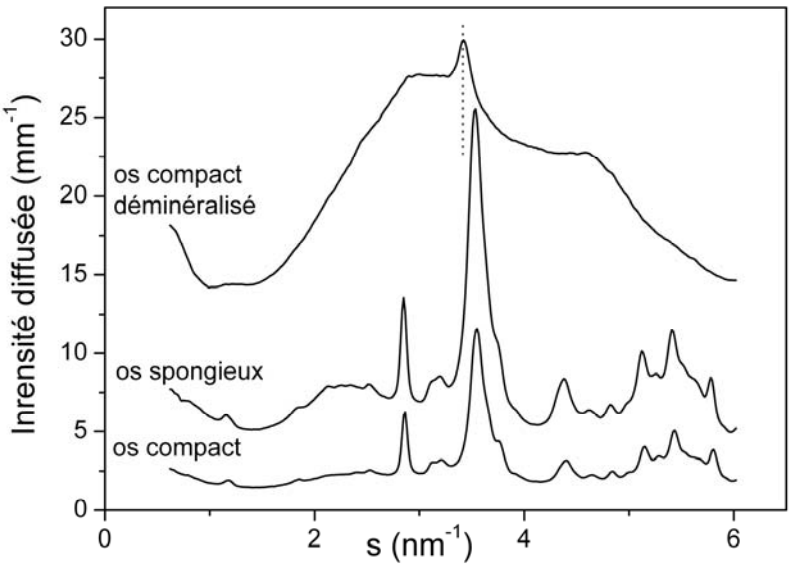


Figure 7 : Regroupements angulaires de clichés de diffraction aux grands angles d'échantillons osseux prélevés sur un fémur de veau. Les phases minérales trouvées dans l'os spongieux et dans l'os compact sont très similaires. Après déminéralisation dans un bain d'EDTA, un pic de structure du collagène devient visible à d = 2,93 Å. (ESRF, 2007).

Le signal de la matrice de collagène fibrillaire est détectable sur le détecteur aux petits angles (Figure 8). Ce signal est relativement faible et souvent couvert par l'intense diffusion aux très petits angles dans les échantillons non déminéralisés. Tout au plus détectons nous les ordres 1 et 3 de la périodicité axiale D. Dans les échantillons déminéralisés le signal de la matrice organique est plus visible. Enfin, les domaines étudiés étaient relativement peu orientés.

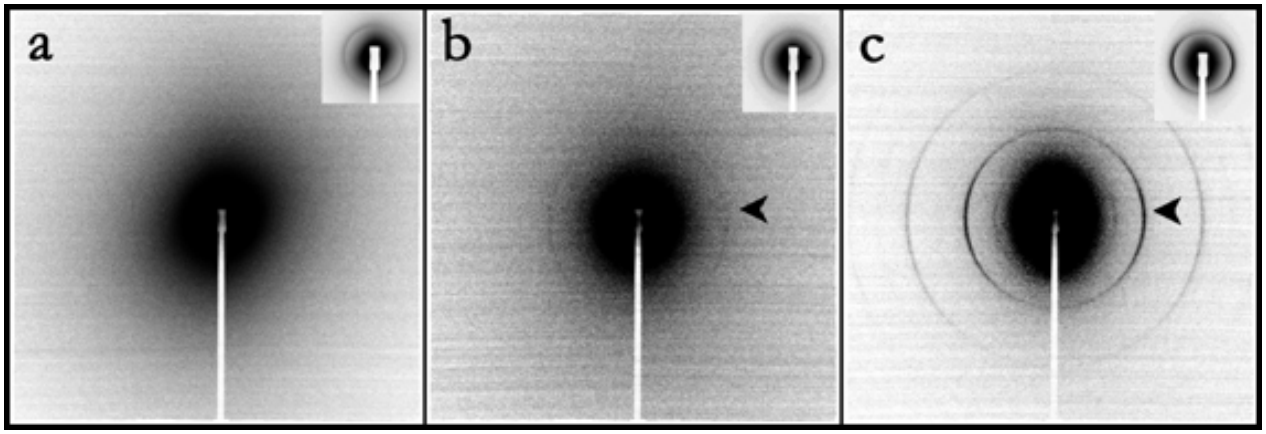


Figure 8 : Clichés de diffusion des rayons X aux petits angles ($D_{\text{échantillon-détecteur}}$ = 5 m) (a) os compact **(b)** os spongieux **(c)** os spongieux déminéralisé. La flèche noire indique la troisième harmonique de la période D = 67 nm. La très intense diffusion aux très petits angles couvre le 1er ordre ; en modifiant les contrastes il est observable dans tous les cas (inserts).

5.2.2 Immersion dans un sérum artificiel (SBF)

Afin de tester *in vitro* la bioactivité d'un matériau artificiel destiné à s'intégrer à l'os (par exemple dans le cadre d'une greffe), Kokubo a suggéré en 1991 d'utiliser une solution nommée *simulated body fluid* (SBF), dont la composition ionique est très proche du fluide extracellulaire[31,32] et contenant notamment des ions calcium et phosphate. Le critère proposé est la formation d'hydroxyapatite à la surface du matériau en question quand celui-ci est immergé dans du SBF. Il existe dans la littérature un grand nombre de recettes proposées car il n'est pas possible d'obtenir la composition exacte du fluide physiologique sanguin à partir de sels.

Synthèse – Bien que le plasma sanguin soit déjà très sursaturé, nous avons utilisé une solution, appelée 1,5-SBF, dont la composition correspond à 1,5 fois les concentrations du SBF afin d'augmenter la fraction de phase minérale dans le composite. Nous en donnons la composition décrite par L.-J. Zhang *et al.* dans le Tableau 3. Nous avons immergé des matrices fibrillaires de collagène dans 5 ml de la solution ainsi préparée pendant plusieurs mois à 20°C et à 37°C. Des tendons de queues de rats servant de témoin ont été immergés dans les mêmes conditions.

Notons enfin que les solutions doivent être utilisées dans des piluliers en plastique neufs. En effet, nous avons observé que le 1,5-SBF précipitait lorsqu'il était placé dans des contenants en verre déjà usagés, les rayures servant de sites de nucléation hétérogène, beaucoup plus efficacement que les matrices de collagène. En revanche, dans les piluliers en plastique et en l'absence de matrice de collagène, aucune précipitation n'est observée dans les temps considérés.

NaCl	213,0 mM
$NaHCO_3$	6,3 mM
KCl	4,5 mM
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,5 mM
$CaCl_2$	3,8 mM
Na_2SO_3	0,75 mM
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2,3 mM

Tableau 3 : Composition du 1,5-SBF. Le pH est ajusté à 7,4 avec un mélange de tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 0,01 mol/L et d'HCl à 0,01 mol/L à 37°C. Tiré de Zhang *et al*. (2004).

Caractérisation – Parmi le nombre d'échantillons préparés, peu ont véritablement donné lieu à un signal d'une quelconque phase minérale cristallisée. En particulier, aucun des échantillons conservés à 20°C n'a donné de résultat positif, jusqu'à 3 mois d'incubation. En revanche, à 37°C (qui est la température physiologique), nous voyons poindre un signal au bout de 3 mois d'incubation (Cf. Figure 9). Ce temps d'incubation est donc beaucoup plus long que celui indiqué dans la bibliographie, qui est de l'ordre de 24 heures.

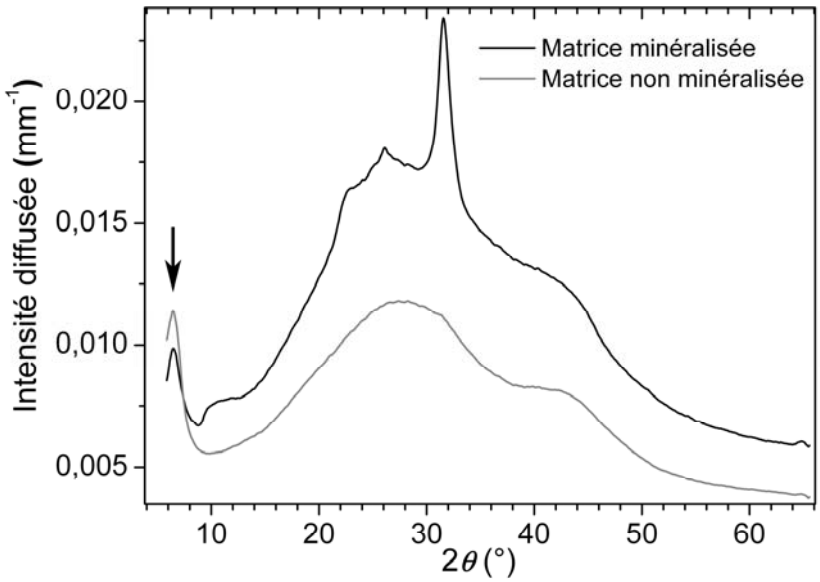


Figure 9 : Profils de diffusion des rayons X aux grands angles d'une matrice fibrillaire de collagène (~100 mg/ml) immergée pendant 3 mois dans du 1,5-SBF à 37°C et d'un témoin non minéralisé. La flèche indique le pic de corrélation latéral des triples hélices de collagène dans les fibrilles et les pics à 2θ = 25,0° et 31,8° correspondent respectivement aux réflexions [002] et au massif non résolu [112] et [300] de l'hydroxyapatite (ESRF, 2006).

Dans ces premières conditions de synthèse, un rapide calcul permet d'estimer à 0,3% la proportion maximale d'hydroxyapatite pouvant être formée dans la matrice de collagène si tous les ions étaient consommés. Par ailleurs, l'appauvrissement du 1,5-SBF conduit à réduire sa sursaturation et donc ralentir la cinétique de précipitation. Par la suite, nous avons changé

régulièrement les réservoirs de 1,5-SBF [§] dans le but de renouveler la source d'ions et d'augmenter la quantité de phase minérale pouvant se former. Ainsi, nous avons pu minéraliser un échantillon présentant un gradient de concentration obtenu dans une microchambre comme celles mentionnées au Chapitre 2 pour l'étude de la phase cholestérique. Le gel fibrillaire ainsi obtenu après remontée de pH présente l'organisation hélicoïdale périodique correspondant à la texture cholestérique[33]. Comme attendu, nous avons observé un signal de fibre isotrope dans la zone diluée en collagène. La phase minérale associée ne présentait pas non plus d'orientation spécifique. En revanche, en se rapprochant de l'interface collagène/air, là où le collagène est le plus concentré, nous avons pu trouver des domaines où le signal de fibre était orienté (Figure 10a), ce qui est cohérent avec ce qui a été observé précédemment, où le collagène s'adsorbe parallèlement à l'interface. Il est remarquable de constater que le signal de la phase minérale présente également une orientation préférentielle corrélée à celle du collagène (Figure 10b). Notamment, la réflexion [002], qui indique l'orientation de l'axe cristallographique *c* des cristallites d'apatite (habituellement plaquettaires) est renforcé perpendiculairement au pic de corrélation relatif à l'empilement latéral des triples hélices de collagène dans les fibrilles. Les cristallites seraient donc orientées le long de l'axe des fibrilles.

Ces résultats confirment que les matrices de collagène servent de sites de nucléation à la phase minérale. D'une part l'observation du coalignement de la phase minérale sur la phase organique suggère une forte interaction de type hétéroépitaxial. D'autre part, nous n'observons pas de précipitation d'une quelconque phase minérale au fond des piluliers contenant le SBF, ce qui indique que malgré la sursaturation la présence d'une interface chargée favorise la nucléation en milieu dense.

[§] Nous aurions aussi pu utiliser un réservoir de plus grand volume…

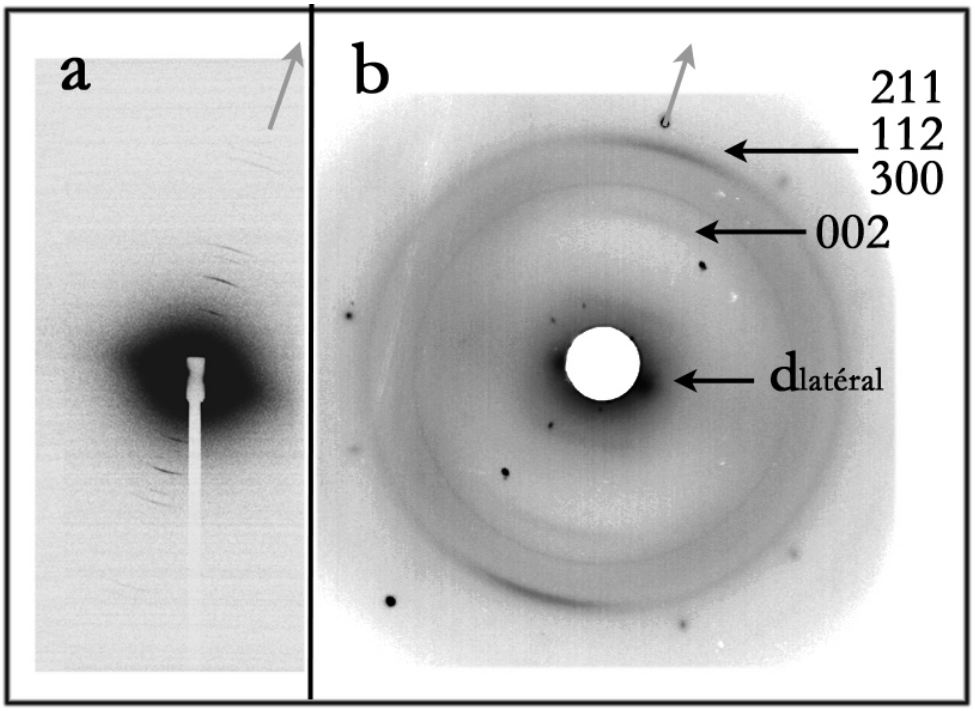


Figure 10 : Diffusion des rayons X aux petits et grands angles par un échantillon concentré en microchambre et laissé pendant 6 mois dans une solution de sérum artificiel (1,5-SBF). (a) Sur le cliché aux petits angles, on observe le signal fortement anisotrope de fibrilles de collagène. On remarque aussi une très forte diffusion aux très petits angles due à la taille des fibrilles et vraisemblablement à la phase minérale. **(b)** Le signal de diffusion aux grands angles recueilli sur une plaque photosensible au même endroit indique la présence d'une phase minérale (apatite) orientée perpendiculairement au signal de fibre latéral. La direction préférentielle des fibrilles est indiquée par les flèches grises. Les taches très intenses sont dues à la diffraction des fenêtres en mica maintenant l'échantillon dans une cellule étanche (ESRF, 2007).

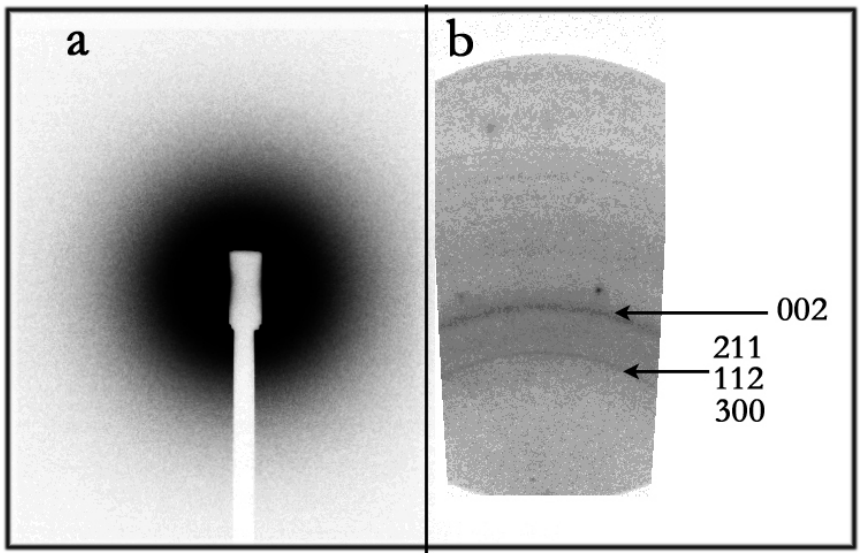


Figure 11 : Diffusion des rayons X aux petits et grands angles par la zone diluée d'une microchambre laissée pendant 6 mois dans une solution de sérum artificiel (1,5-SBF).
(a) Aux petits angles, nous ne détectons qu'une très intense diffusion centrale isotrope.
(b) Aux grands angles, nous détectons les principaux pics de l'apatite, formant des anneaux isotropes.

5.2.3 Double diffusion

La formation de cristaux de phosphate de calcium (qui ne sont pas nécessairement de l'apatite) est immédiate lorsque l'on mélange une solution de chlorure de calcium et une solution de phosphate de sodium relativement concentrées à pH neutre ou basique. Partant, l'idée la plus évidente pour minéraliser rapidement des matrices de collagène encore hydratées est d'y faire diffuser des ions calcium et phosphate afin qu'ils se rencontrent et précipitent au sein de la matrice organique.

Synthèse – En pratique, nous avons utilisé des solutions dont les concentrations respectives en calcium et phosphate correspondent à un rapport Ca/PO_4 égal à 1,67 pour le mélange, ce qui représente le rapport stoechiométrique dans l'hydroxyapatite. La concentration de la solution de chlorure de calcium est donc 110 mM ($CaCl_2$, pH 5,8) et celle de phosphate de sodium dibasique 66 mM (Na_2HPO_4, pH 12)[**].
Deux types de montages ont été élaborés. Le premier consiste à planter des aiguilles de seringue dans la matrice de collagène placée dans un capillaire. Les solutions sont alors amenées soit par gravité, en plaçant les réservoirs en hauteur, soit à l'aide de pousses seringues. Dans le second montage, la diffusion se fait à travers deux membranes de dialyse, placées de part et d'autre de la matrice. Ce second montage a permis d'augmenter la surface de contact entre la matrice et le réservoir ionique.

Caractérisation – Le premier montage, à l'intérieur d'un capillaire de verre, s'est révélé infructueux du fait de la difficulté de confiner les ions à l'intérieur de la matrice et d'éliminer le liquide superflu. En effet, nous avons remarqué que les solutions préféraient contourner les matrices pour précipiter autour d'elles.
Le second montage a donné des résultats de façon moins aléatoire et nous a permis d'enregistrer des clichés de diffusion des rayons X en laboratoire (Figure 12 et Figure 13).

[**] Quand on part d'une solution de NaH_2PO_4, à pH plus acide, la phase obtenue est de la brushite (dicalcium dihydraté, $CaHPO_4$-$2H_2O$).

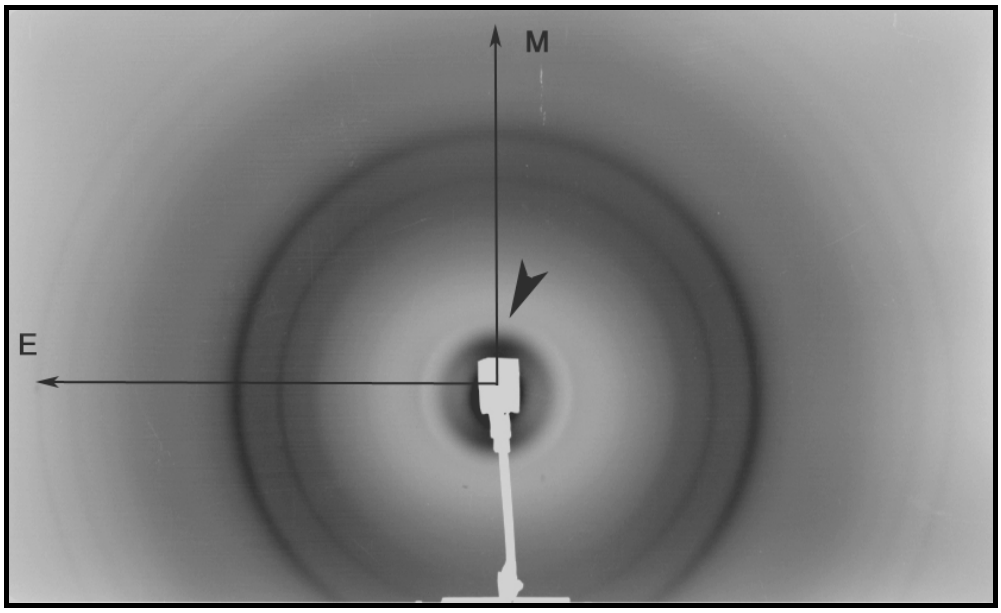


Figure 12 : Cliché de diffraction d'une matrice de collagène à environ 200 mg/ml minéralisé par double diffusion de chlorure de calcium (110 mM) et de phosphate de sodium (66 mM). La flèche indique le signal d'interdistance moléculaire du collagène à l'intérieur des fibrilles. (Montage sous vide, anode tournante au Molybdène, LPS).

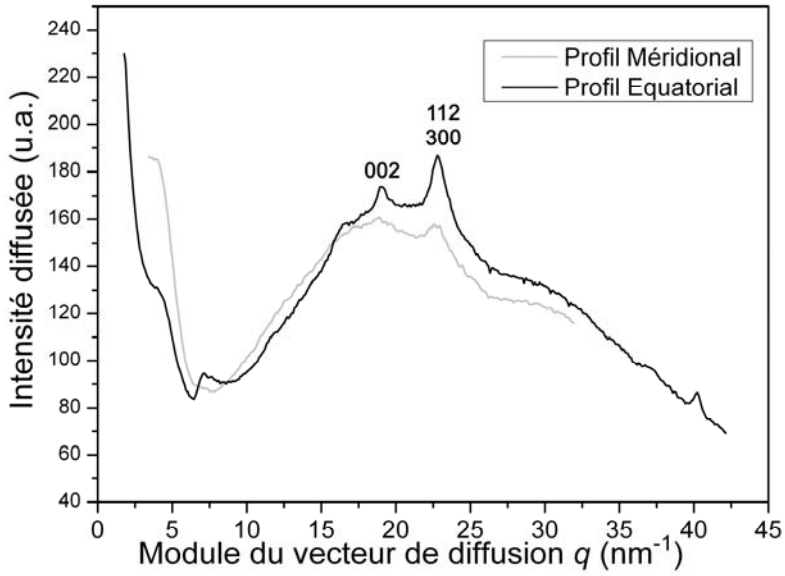


Figure 13 : Profils linéaires pris suivant l'axe méridional (M) et l'axe équatorial (E) du cliché présenté en Figure 12. Les variations d'intensité des signaux de la phase minérale et de la phase organique montrent leur orientation perpendiculaire.

Sur ce cliché, nous avons pu mettre en évidence la coexistence de la phase fibrillaire anisotrope, *via* le signal d'interdistance moléculaire (d_{ave} ~ 1,81 nm) et de pics de Bragg de la phase cristalline identifiée comme étant de l'apatite (d_{112} = 2,75 Å, d_{002} = 3,32 Å), renforcés dans la direction équatoriale. Parmi les échantillons que nous avons pu préparer, il nous a semblé que la durée du contact avec les solutions jouait un rôle important sur la phase minérale obtenue. Pour les temps courts (< 1 semaine), nous avons plutôt obtenu des mélanges de phases avec une multitude de

pics de diffraction. Au-delà d'un mois, en réapprovisionnant régulièrement les réservoirs, nous ne distinguons plus qu'une seule phase. Malheureusement nous n'avons pas eu le temps de confirmer cet effet cinétique.

Ici aussi, il s'est révélé crucial de renouveler régulièrement les réservoirs d'ions, non seulement pour augmenter la quantité de phase minérale précipitant au sein de la matrice fibrillaire, mais surtout pour maintenir le pH globalement neutre. En effet, en précipitant, les ions phosphates et et hydroxyles (HO^-) cessent de contribuer à maintenir le pH de la solution autour de 7,4. Or, il est doublement important de maintenir la neutralité du milieu : d'une part une augmentation de l'acidité risque de ressolubiliser la matrice de collagène et d'autre part, elle favorise la formation de brushite, variété allotropique de l'hydroxyapatite non désirée. Une autre solution consisterait à tamponner les solutions salines avec, par exemple, du Tris.

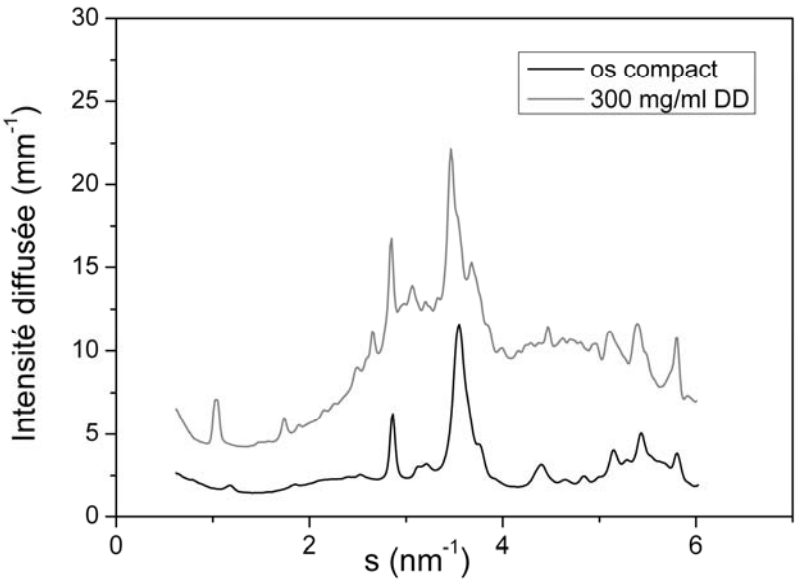


Figure 14 : Comparaison du signal de diffraction d'une matrice de collagène à 300 mg/ml minéralisée par double diffusion et d'un échantillon d'os compact. (Regroupements angulaires de clichés isotropes de diffraction des rayons X aux grands angles. (ESRF, 2007).

5.2.4 Coprécipitation des phases organique et minérale par remontée de pH

Une méthode de synthèse de l'hydroxyapatite par voie douce, inspirée d'un protocole de précipitation de carbonates de calcium ($CaCO_3$) proposé par L. Addadi[34] a été mise au point au laboratoire par N. Nassif††. Elle consiste en la remontrée de pH d'une solution acide contenant des ions phosphate et calcium, par diffusion de vapeurs d'ammoniac (NH_3) à partir d'une

†† Le protocole et la caractérisation complète des phases minérales en l'absence de collagène sont en cours de publication.

solution aqueuse d'ammoniaque (NH_4OH) ou par décomposition thermique de carbonate d'ammonium ($(NH_4)_2CO_3$) à température ambiante. Cette méthode a été mise au point pour tenir compte des contraintes imposées par le collagène : stabilité des fibrilles en pH et en température.

Synthèse – Les solutions denses de collagène sont dialysées contre une solution d'acide acétique contenant 110 mM de chlorure de calcium et 66 mM de phosphate de sodium monobasique (pH ~ 2-3) pendant environ 12 heures ; dans certains cas nous avons rajouté du polyaspartate (1,2 kDa, 333 µg/ml) dans le bain de dialyse. Le polyaspartate est décrit comme un transporteur ionique permettant de minéraliser des matrices organiques par interaction avec le calcium[26,35]. L'échantillon dialysé et le bain de dialyse sont placés dans une enceinte d'un litre en présence de 8 ml d'une solution d'ammoniaque à 30% ou de 4 grammes de carbonate d'ammonium. La tension de vapeur de l'ammoniac étant élevée, l'évaporation de la solution ou la décomposition thermique du sel par sublimation vont progressivement remonter le pH de la solution, ce qui a pour effet d'induire simultanément la fibrillogenèse du collagène et la cristallisation de l'apatite. Le pH final des solutions est de ~10,5. Or nous savons grâce à l'étude du chapitre 3 que les fibrilles natives sont parfaitement stables à ce pH.
Nous avons préparé des échantillons à partir de solutions de concentration allant de 5 mg/ml à 300 mg/ml.

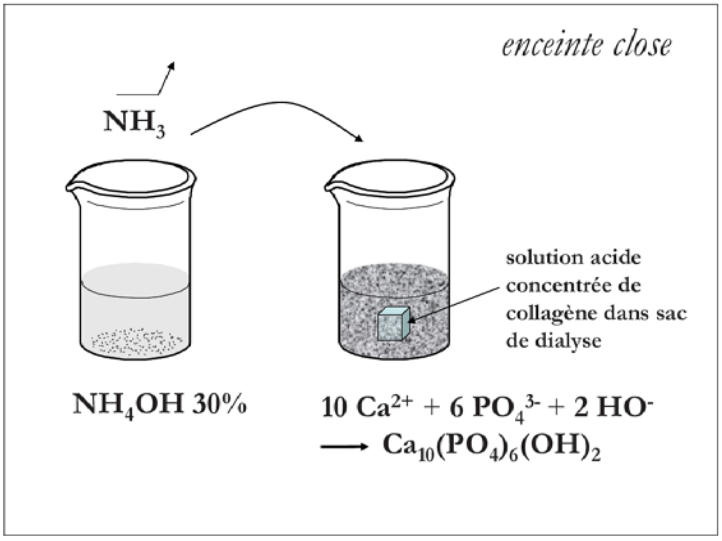


Figure 15 : Schéma représentant la technique de coprécipitation de fibrilles de collagène et de l'hydroxyapatite. Les vapeurs d'ammoniaque ont pour effet de remonter le pH de la solution contenant les ions calcium et phosphate dans lequel baigne une cellule de dialyse contenant la solution concentrée de collagène. L'élévation du pH a pour effet de faire précipiter les ions sous forme d'hydroxyapatite et d'induire la fibrillogenèse de la matrice de collagène.

Caractérisation – Cette méthode nous a aussi permis d'obtenir des résultats encourageants, comme l'atteste la Figure 16. Nous détectons bien une phase minérale dont les réflexions caractéristiques sont orientées le long de l'axe des fibrilles de collagène.

Malheureusement, comme les ions du réservoir de dialyse précipitent eux aussi immédiatement, une fois la nucléation amorcée, il ne reste plus assez d'ions pour permettre aux cristallites de croître. Le taux de minéralisation des matrices de collagène semble aussi être très limité. Par ailleurs, nous n'avons pas noté d'influence de la concentration sur la quantité ou la taille des cristallites, à part dans les solutions très diluées où des cristallites de taille micrométrique sont observées en microscopie optique. De façon générale, il apparaît que les échantillons les moins denses (10-100 mg/ml en collagène) présentent très peu de signal de diffraction du minéral. La densité de la phase organique semble donc être un paramètre crucial.

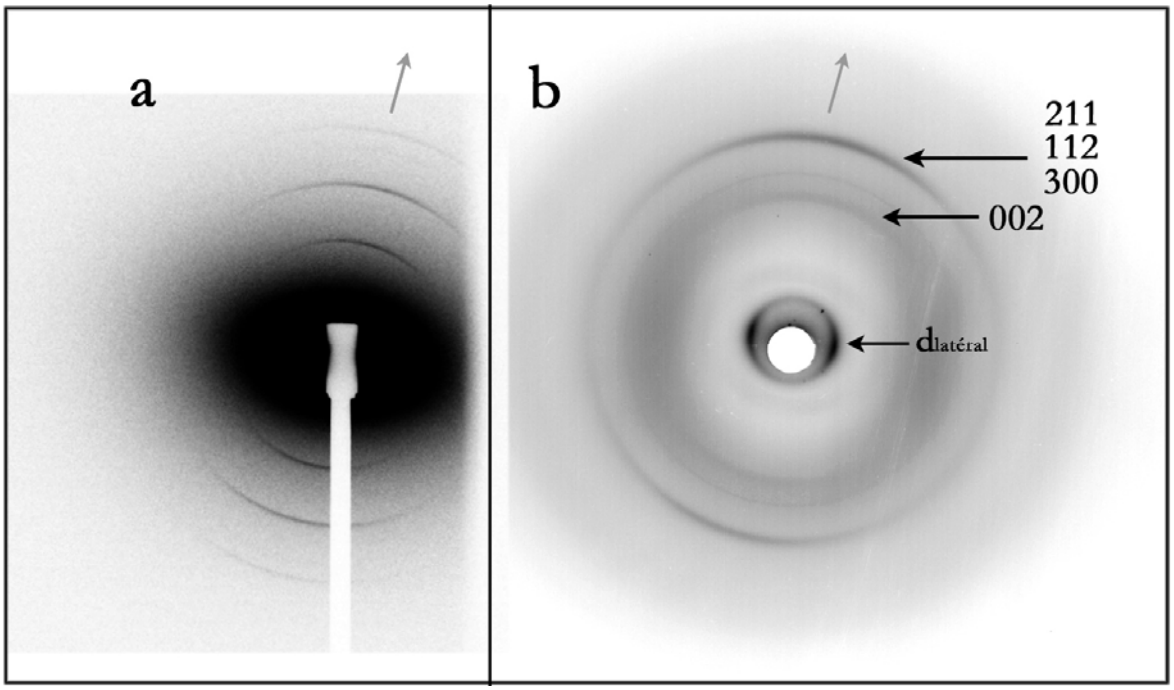


Figure 16 : Diffusion des rayons X aux petits et grands angles par un échantillon à 300 mg/ml minéralisé par coprécipitation en présence de polyaspartate (a) Sur le cliché aux petits angles on observe le signal caractéristique des fibrilles de collagène. On remarque aussi une très forte diffusion aux très petits angles due à la taille des fibrilles et vraisemblablement à la phase minérale. **(b)** Le signal de diffusion aux grands angles recueilli sur une plaque photosensible indique la présence d'une phase minérale (apatite) dont le signal est renforcé perpendiculairement à l'orientation du signal de fibre latéral. La direction préférentielle des fibrilles est indiquée par les flèches grises. (ESRF, 2007).

5.2.5 Récapitulation

La diffraction des rayons X aux grands angles couplée à la diffusion des rayons X aux petits angles nous a permis d'établir que les gels fibrillaires de collagène denses préparés *in vitro* permettaient la nucléation de cristaux d'apatite et pouvaient orienter leur croissance.

La démonstration de la possibilité d'un coalignement entre la phase minérale et la phase organique passait par la préparation d'échantillons alignés de façon unaxiale et la recherche de monodomaines. Cependant, nous ne sommes pas, *a priori*, limités à cette géométrie. En effet, l'objectif poursuivi est la préparation d'échantillons dont la structure hélicoïdale est conservée. Désormais, cet objectif nous semble accessible puisque i) nous sommes capables de produire des gels fibrillaires conservant la structure de la phase cholestérique et ii) nous arrivons à faire nucléer une phase minérale qui suit l'orientation des fibrilles de collagène. Évidemment, le pas cholestérique étant de l'ordre de 1-10 µm, la démonstration en diffusion des rayons X nécessiterait l'utilisation d'un microfaisceau comparable à celui utilisé par Wagermaier *et coll.* pour l'étude des ostéones (c'est-à-dire d'un micron de diamètre) ou par Bigi *et coll.* sur des écailles de poisson[36]. La microscopie et la diffraction électroniques peuvent aussi être d'un grand secours pour étudier l'effet d'orientation de la phase minérale par la phase organique.

5.2.6 Etude préliminaire par microscopie électronique à transmission

Outre que la préparation des échantillons pour la microscopie électronique est coûteuse en temps, elle est source de nombreux artefacts dus au contrastant. Compte tenu des résultats obtenus dans un premier temps, où nous avons eu des problèmes de précipitation du contrastant sur les fibres de collagène (Figure 17a). Dans ces conditions, il nous était impossible de pouvoir discerner d'éventuelles cristallites sur les fibrilles, comme décrit dans la littérature (Figure 17c). Aussi, pour pouvoir valider nos observations, nous avons dû observer des coupes non contrastées (Figure 17b), où le collagène est alors très peu visible. Le minéral se présente sous forme de plaquettes qui, vues de profil, ont l'aspect d'aiguilles noires de quelques centaines de nanomètres de long. Nous n'avons cependant pas pu discerner un quelconque ordre induit par la structure de la phase organique (Figure 18a). Pire, le minéral semble précipiter préférentiellement dans les zones les moins denses en collagène (Figure 18b).

Enfin, certains échantillons n'ont jamais pu être observés faute d'avoir pu être coupés. Il se peut donc que les échantillons les plus denses et les plus minéralisés n'aient donc jamais été observés.

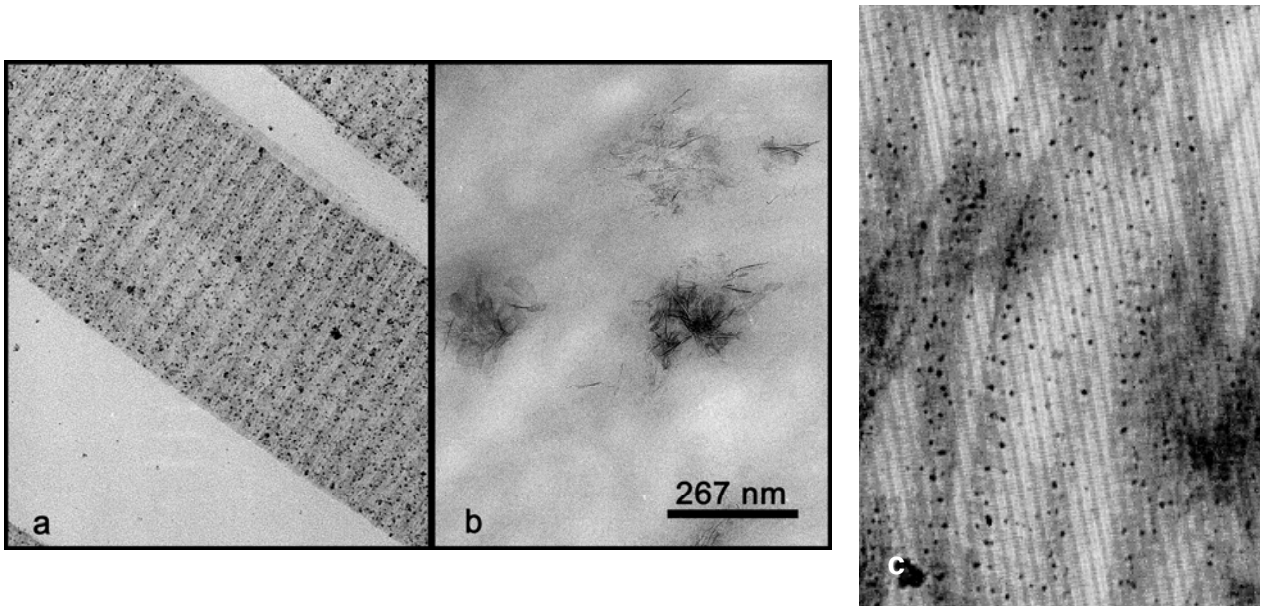


Figure 17 : Microscopie électronique à transmission. (a) Dépôts de contrastant sur une fibre de tendon de queue de rat. **(b)** Minéral observé dans un de nos échantillons préparés par double diffusion (échantillon non contrasté). **(c)** Grandissement d'une zone intercellulaire dans une section de l'os périostéal d'un embryon de poulet de 16 jours. Des petites particules, de moins de 100 Å sont principalement localisées dans les bandes périodiques des fibrilles (× 65000). NB : les bandes obliques verticales sont dues à un problème de scan. Tiré de Fitton-Jackson (1957).

L'observation de nos échantillons par microscopie électronique à transmission est donc très délicate et requiert de multiples précautions. Notons que, pour l'instant, les échantillons ayant donné des résultats encourageants en diffusion et diffraction des rayons X n'ont pu être observés.

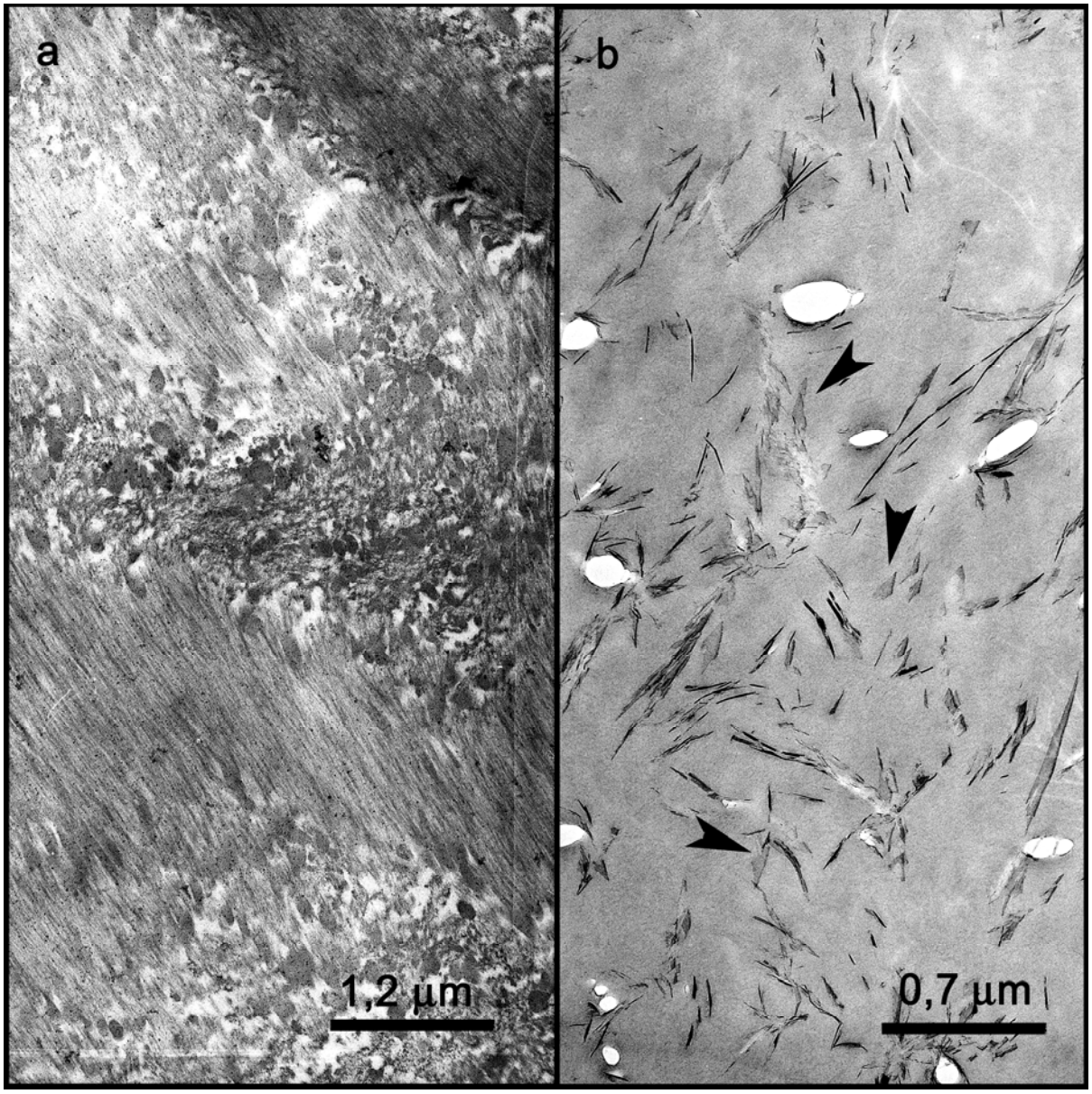


Figure 18 : Echantillon minéralisé par double diffusion. (a) Coupe contrastée. La trame organique est très dense ; les fibrilles de collagène sont organisées en un contreplaqué avec une alternance de zones transverses et de zones longitudinales. L'observation d'une éventuelle phase minérale est ici malaisée. **(b) Coupe non contrastée.** Ce cliché correspond vraisemblablement à une zone moins dense en collagène. On y retrouve de nombreuses cristallites. Les flèches noires indiquent les plaquettes vues de face (moins denses aux électrons).

5.2.7 Limite de la méthode

Que ce soit en diffusion des rayons X ou en microscopie électronique à transmission, la principale difficulté vient de la faible quantité de la phase minérale ; étant donnée la concentration ionique de nos solutions, même si tous les sels précipitaient dans nos matrices de collagène, les proportions minéral/organique seraient bien loin de celles d'un tissu minéralisé (vraisemblablement de quelques pourcents). D'après des calculs simples, le pourcentage de phase

minérale atteint dans nos échantillons serait au plus de l'ordre de quelques pourcents, alors que dans l'os, par exemple, le pourcentage massique de la phase minérale est de l'ordre de 66-80%. La poursuite de la caractérisation de ces différents échantillons inclut donc une analyse thermogravimétrique afin d'estimer les proportions exactes eau/collagène/minéral des composites synthétisé.

D'un autre côté, l'étude que nous avons menée n'a été possible que parce que les échantillons étaient relativement peu minéralisés et les cristallites très petites. En effet, dès que les échantillons sont plus minéralisés le signal de diffusion de la phase minérale devient très intense et couvre celui des fibrilles de collagène, comme dans le cas de l'os (Cf. Figure 8). Il se peut aussi que l'orientation des cristaux se décorrèle de celle du collagène en s'éloignant de la surface des fibrilles. Enfin, les échantillons deviennent plus difficiles à couper en sections ultrafines pour la microscopie électronique à transmission.

Enfin, si nous maîtrisons relativement bien la structure des matrices de collagène de 5 à 15%, notamment leur alignement, celles-ci sont encore trop peu denses pour réellement orienter la phase minérale. Celle-ci poussera préférentiellement dans les espaces interfibrillaires et les zones les moins denses en collagène (Figure 18b). Nous n'avons donc pu observer un coalignement entre la phase minérale et la phase organique en diffusion des rayons X que sur des gels fibrillaires d'au moins 200 mg/ml.

5.3 Conclusion et perspectives

Les expériences menées dans le cadre de ce chapitre nous ont permis d'évaluer les difficultés expérimentales auxquelles peuvent se heurter la réalisation d'une idée simple et, espérons-le, de proposer quelques pistes pour la poursuite de ce travail.

Nous avons eu la chance d'avoir accès à plusieurs reprises à un rayonnement synchrotron, ce qui nous a permis de tester de nombreux échantillons et donc de quadriller un certain nombre de conditions favorables à la réussite du projet ; cependant, une fois la préparation des échantillons optimisée, un montage de laboratoire pourra être suffisant pour la poursuite de l'étude. Néanmoins, si l'on décide de s'orienter vers une analyse microscopique plus résolue dans l'espace, notamment l'organisation chirale des cristaux d'apatite, le recours à un microfaisceau s'avérera nécessaire.

Ainsi, nous avons réussi à mettre en évidence un coalignement de la phase minérale à l'échelle d'un matériau tridimensionnel, dense et ordonné. Jusqu'ici, les nombreux travaux concernant la

minéralisation du collagène réassemblé concernaient des gels peu denses et peu ordonnés, et le seul exemple de coalignement observé était au niveau d'une seule fibrille ou de tendons.
À plusieurs reprises nous avons constaté que la densité en collagène était déterminante. Ceci peut s'expliquer à plusieurs égards. Tout d'abord, il est évident que la matrice de collagène doit être suffisamment dense pour contraindre la croissance cristalline, l'orienter et aussi limiter la taille des cristallites. Par ailleurs, la minéralisation est sans doute favorisée par la densité de fibrilles présentes dans la matrice. Outre la caractérisation complète en microscopie électronique à haute résolution et par analyse thermogravimétrique des échantillons déjà obtenus, la poursuite de ce travail consisterait à chercher à faire croître le minéral dans des proportions comparables à celles observées dans l'os. Ceci peut éventuellement passer par la combinaison de deux méthodes. Nous pourrions aussi chercher à élucider l'influence et le rôle de polymères acido-solubles de synthèse tels que des polyaspartates ou des polyglutamates sur la minéralisation.

Perspectives – L'étude mécanistique de la croissance cristalline sur les fibrilles de collagène peut être envisagée par l'utilisation du système bidimensionnel de fibrilles de collagène de Cisneros *et al.*[37,38]. En effet cette équipe est capable de produire des rubans mais aussi des films continus de fibrilles de collagène, et de suivre leur évolution en microscopie à force atomique environnementale. Une méthodologie similaire permettrait d'envisager de suivre une croissance cristalline sur des films continus de collagène afin de mettre en évidence un éventuel effet *template*.

En revanche, les matrices tridimensionnelles minéralisées que nous avons obtenues peuvent présenter des propriétés mécaniques intéressantes du point de vue de la synthèse de (bio)matériaux[39]. Ces propriétés mécaniques restent évidemment à tester, soit localement par des expériences de nano-indentation, soit à une échelle macroscopique par des tests de traction et de compression.

Références du Chapitre 5

[1] Christoffersen J. et Landis W.J. "A Contribution with Review to the Description of Mineralization of Bone and and Other Calcified Tissues *In Vivo*" *The Anatomical Record* **230** 4 (1990) 435-450.

[2] Bouligand "Sur l'existence de « pseudomorphoses cholestériques » chez divers organismes vivants" *Journal de Physique* **11-12** tome 30 (1969) C4-90.

[3] Bouligand Y. "Twisted Fibrous Arrangements in Biological Materials and Cholesteric Mesophases" *Tissue & Cell* **4**:2 (1972) 189-217.

[4] Weiner S., Traub W., Wagner H.D. "Lamellar Bone: Structure Function Relations" *J. Struct. Biol.* **126** (1999) 241-255.

[5] Weiner S. et Traub W. "Bone Structure: From Ångstroms to Microns" *FASEB journal* **6**, (1992) 879-885.

[6] Traub W., Arad T., Weiner S. " Three-dimensional Ordered Distribution of Crystals in Turkey Tendon Collagen Fibers" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 9822-9826.

[7] Giraud-Guille M.-M. "Liquid-Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen" *Biol. Cell.* **67** (1989) 97-101.

[8] Besseau L. et Giraud-Guille M.-M. "Stabilization of Fluid Cholesteric Phases of Collagen to Ordered Gelated Matrices" *J. Mol. Biol.* **251** (1995) 197-202.

[9] Kikuchi M., Itoh S., Ichinose S., Shinomiya K., Tanaka J. "Self-organization Mechanism in a Bone-like Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Synthesized *in Vitro* and its Biological Reaction *in Vivo*" *Biomaterials* **22** (2001) 1705-1711.

[10] Wu C., Sassa K., Iwai K., Asai S. "Unidirectionnally Oriented Hydroxyapatite/Collagen Composite Fabricated by Using a High Magnetic Field" *Materials Letters* **61** (2007) 1567-1571

[11] Giraud-Guille M.-M. "Plywood Structure in Nature" *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **3** (1998) 221-227.

[12] Glimcher M.J. "Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation" *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* **64** (2006) 223-283.

[13] Giraud-Guille M.-M. "Twisted Plywood Architecture of Collagen Fibrils in Human Compact Bone Osteons" *Calcif. Tissue Int.* **42** (1988) 167-180.

[14] Zhang L.-J., Feng X.-S., Liu. H.-G., Qian D.-J., Zhang L., Yu X.-L., Cui F.-Z. "Hydroxyapatite/Collagen Composite Materials Formation in Simulated Body Fluid Environment" *Materials Letters* **58** (2004) 719-722.

[15] Wenk H.-R. et Heidelbach F. "Crystal Alignment of Carbonated Apatite in Bone and Calcified Tendon: Results From Quantitative Texture Analysis" *Bone* **24** (1999) 361-369.

[16] Dorozhkin S.V. et Epple M. "Biological and medical significance of calcium phosphates" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41** (2002) 130–3146.

[17] Glimcher M.J. "Molecular Biology of Mineralized Tissues with Particular Reference to Bone" *Rev. Mod. Phys.* 31 (1959) 359-393.

[18] Fitton-Jackson S. "The Fine Structure of Developing Bone in the Embryonic Fowl" *Proc. R. Soc. Ser. B* **146** (1957) 270-280.

[19] Landis W.J. et Hodgens K.J. "Mineralization of Collagen May Occur on Fibril Surfaces: Evidence from Conventional and High-Voltage Electron Microscopy and Three Dimensional Imaging" *J. Struct. Biol.* **117** (1996) 24-35.

[20] Glimcher M.J. et Muir H. "Recent Studies of the Mineral Phase in Bone and Its Possible Linkage to the Organic Matrix by Protein-Bound Phosphate Bonds (and Discussion)" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **304** (1984) 479-508.

[21] Jäger I. et Fratzl P. "Mineralized Collagen Fibrils: A Mechanical Model with a Staggered Arrangement of Mineral Particles" *Biophys. J.* **79** (2000) 1737-1746.

[22] Wagermaier W., Gupta H.S., Gourrier A., Burghammer M., Roschger P., Fratzl P. "Spiral Twisting of Fiber Orientation Inside Bone Lamellae" *Biointerphases* **1**:1 (2006) 1-5.

[23] Bigi A., Burghammer M., Falconi R., Koch M.H.J., Panzavolta S. and Riekel C. "Twisted Plywood Pattern of Collagen Fibrils in Teleost Scales: An X-ray Diffraction Investigation" *J. Struct. Biol.* **136** (2001)137-143.

[24] Glimcher M.J., Hodge A.J., Schmitt F.O. "Macromolecular Aggregation States in Relation to Mineralization: The Collagen-Hydroxyapatite System as Studied in Vitro" *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **43** (1957) 860-867.

[25] Andre-Frei V., Chevallay B., Orly I., Boudeulle M., Huc A., Herbage D. "Acellular Mineral Deposition in Collagen-Based Biomaterials Incubated in Cell Culture Media" *Calcif-Tissue-Int.* **66** (2000) 204-211.

[26] Bradt J.-H., Mertig M., Teresiak A., Pompe W. "Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation" *Chem. Mater.* **111** (1999) 2694-2701.

[27] Zhai Y. et Cui F.Z. "Recombinant Human-like Collagen Directed Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals" *J. Cryst. Growth* **291** (2006) 202-206.

[28] Martinot F. "Précipitation de Phosphate de Calcium dans des Matrices Organiques Biomimétiques" Rapport de stage de Master 1 Université Paris 7 Denis Diderot. (2006)

[29] Chen J., Burger C., Krishnan C.V., Chu B., Hsiao B.S., Glimcher M.J. "*In Vitro* Mineralization of Collagen in Demineralized Fish Bone" *Macromol. Chem. and Phys.* **206** (2005) 43-51.

[30] Rich A. & Crick F.H.C. "The Molecular Structure of Collagen" *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 483-506.

[31] Kokubo T. et Hiroaki Takadama "How Useful is SBF in Predicting *in Vivo* Bone Bioactivity?" *Biomaterials* **27** (2006) 2907-2915.

[32] Kokubo T. "Bioactive Glass Ceramics: Properties and Applications." *Biomaterials* **12** (1991) 155-163.

[33] Mosser G., Anglo A., Helary C., Bouligand Y., Giraud-Guille M.-M. "Dense Tissue-like Collagen Matrices Formed in Cell-free Conditions" *Matrix Biol.* **25** (2006) 3-13.

[34] Addadi L., Moradian J., Shay E., Maroudas N. G., Weiner S. "A Chemical Model for the Cooperation of Sulfates and Carboxylates in Calcite Crystal Nucleation: Relevance to Biomineralization" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 2732-2736.

[35] Gehrke N., Nassif N., Pinna N., Antonietti, Gupta H.S., Cölfen H. "Retrosynthesis of Nacre via Amorphous Precursor Particles" *Chem. Mater.* **17** (2005) 6514-6516.

[36] Bigi A., Burghammer M., Falconi R., Koch M.H.J., Panzavolta S., Riekel C. "Twisted Plywood Pattern of Collagen Fibrils in Teleost Scales: An X-ray Diffraction Investigation" *J. Struct. Biol.* **136** (2001) 137-143.

[37] Jiang F., Horber H., Howard J., Muller D.J. "Assembly of Collagen into Microribbons: Effects of pH and Electrolytes" *J. Struct. Biol.* **148** (2004) 268–278.

[38] Cisneros D.A., Hung C., Franz C. M., Muller D. J., "Observing Growth Steps of Collagen Self-Assembly by Time-lapse High-resolution Atomic Force Microscopy" *J. Struct. Biol.* **154** (2006) 232-235

[39] Sanchez C., Arribart H., Giraud-Guille M.-M., "Biomimetism and Bioinspiration as Tools for the Design of Innovative Materials and System" *Nature Materials* **4** (2005) 1-12.

Conclusion et perspectives

Is that all there is?
- Jerry Leiber/Mike Stoller

Les premières phases cristal liquides de collagène ont été identifiées pour la première fois il y a une vingtaine d'années en microscopie optique à lumière polarisée[1,2]. Dans le présent ouvrage, notre objectif était d'atteindre un meilleur contrôle dans la préparation de ces phases afin de les caractériser de façon plus rigoureuse, notamment du point de vue physico-chimique et thermodynamique. Ce travail a donc nécessité l'élaboration d'un protocole d'extraction du collagène nous permettant de préparer des quantités suffisantes de solutions denses raisonnablement pures dont on pouvait contrôler les paramètres physicochimiques que sont la concentration, la force ionique et le pH. Nous avons notamment mis en évidence l'effet de la force ionique du solvant sur les concentrations critiques à la transition et relié celles-ci à des modèles théoriques pour des polyélectrolytes allongés semi-flexibles. L'utilisation de la diffusion des rayons X couplée à des mesures rhéologiques nous a permis d'élucider certaines caractéristiques de ces solutions. Grâce à l'observation de pics de corrélation d'ordre liquide dans les phases nématiques et isotropes concentrées, nous avons pu établir une loi de dilution entre 20 et 160 mg/ml et mesurer le paramètre d'ordre des solutions nématiques. Dans la même gamme de concentration, le module élastique prend le pas sur le module visqueux. Néanmoins, les solutions restent avant tout viscoélastiques et l'ordre orientationnel des triples hélices dans la phase nématique semble favoriser leur fluidification.

Toujours en milieu acide, nous avons commencé à rassembler un certain nombre d'indications de la mise en place d'un ordre de position axial au sein des solutions nématiques. Aux environs de 100 mg/ml, nous avons dernièrement observé en diffusion des rayons X un pic de Bragg méridional correspondant à une période d'environ 144-153 nm. L'interprétation de ce pic nécessiterait cependant une caractérisation plus complète. À première vue, il pourrait s'agir soit de la formation de domaines lamellaires au sein de la phase nématique, soit de la présence

d'agrégats protofibrillaires, dans lesquelles les triples hélices sont décalées d'une période d'environ 2*D*.

À plus haute concentration, à partir de 200 mg/ml, nous observons sans équivoque le signal caractéristique de fibrilles de collagène, dont la structure peut aussi être interprétée comme celle d'une phase lamellaire[3], dans laquelle les molécules sont décalées axialement d'une périodes *D*. Ces dernières observations ont par ailleurs été confirmées en microscopie électronique.

Par ailleurs, notre nouvelle maîtrise et compréhension des solutions concentrées de collagène nous a ouvert l'accès à l'étude systématique de la fibrillogenèse en milieu dense. Jusqu'ici ce phénomène avait essentiellement été étudié en milieu dilué (environ 5 mg/ml), mais des travaux réalisés dans l'équipe ont montré qu'il était possible de stabiliser la structure des phases cristal-liquides cholestériques sous la forme de gels fibrillaires[4,5]. Cependant, dans ces travaux, les concentrations étaient connues *a posteriori* et de façon approximative puisque les échantillons étaient constitués d'un gradient de concentration produit par l'évaporation de solutions diluées.

Nous avons donc entrepris de préparer des gels fibrillaires denses et orientés, dans des conditions de concentration, de pH et de force ionique contrôlées afin d'en déterminer l'influence sur la structure des fibrilles formées. Nous avons constaté que la taille moyenne des fibrilles formées variait largement suivant la concentration initiale de triples hélices en solution ; nous avons attribué ce comportement largement non-monotone à des considérations relatives à la nucléation et à la croissance des fibrilles en fonction de la disponibilité et de la mobilité des triples hélices dans le milieu. D'une certaine façon, ces données s'accordent avec les mesures rhéologiques effectuées sur les solutions acides initiales. Néanmoins, ces dernières se révèlent insuffisantes puisque le suivi cinétique par diffusion des rayons X démontre que la mise en place du décalage périodique des triples hélices à l'intérieur des fibrilles se poursuit pendant plusieurs heures après la formation des premiers agrégats. Il faudrait donc estimer la mobilité moléculaire à l'intérieur des gels en train de se former. Comme cette caractérisation est difficilement envisageable à l'échelle macroscopique du fait de l'existence d'un front de diffusion, nous pourrions avoir recours à des expériences de microrhéologie[6], qui permettraient de sonder la structure locale du réseau moléculaire initial se transformant progressivement en un réseau fibrillaire.

Par ailleurs, nous avons délimité une large gamme de pH dans laquelle les fibrilles se forment et restent stables, sans observer de différence morphologique ou structurale notable entre les pH 5 et 12. Bien évidemment, les limites de cette gamme sont susceptibles de varier en fonction de la nature du tampon et de la composition du solvant. Ici, nous avons essentiellement travaillé en

tampons phosphates. D'autre part, la force ionique joue un rôle crucial sur l'agrégation des fibrilles et donc la structure microscopique du gel. À très faible force ionique, les gels formés sont relativement lâches et formés de nanofibrilles, tandis qu'à des forces ioniques supérieures, les fibrilles sont plus grosses et tendent à s'agréger en fibres.

Enfin, le contrôle de l'organisation des gels fibrillaires orientés nous a permis d'élaborer des composites collagène/apatite, dans lesquels la nucléation de la phase minérale est orientée par la phase organique. Ces résultats prometteurs laissent entrevoir la possibilité de synthétiser des matériaux dont la microstructure mime celle de l'os. Pour l'heure, la quantité de minéral inclus dans la matrice organique est bien trop faible pour lui conférer une dureté comparable ; la poursuite immédiate de ces travaux consisterait donc à améliorer l'étape de croissance de la phase minérale et de la valider par des tests mécaniques. Aussi, il serait intéressant de minéraliser des gels fibrillaires hélicoïdaux.

*

Il est aussi nécessaire d'évaluer dans quelle mesure ces résultats *in vitro* permettent d'éclaircir certains phénomènes *in vivo*. En particulier, même si nos conditions expérimentales ne sont pas strictement les mêmes, certains comportements, uniquement guidés par des considérations physico-chimiques, ne doivent pas être très modifiés par l'environnement *in vivo*.
Ainsi, la formation *in vitro* d'une structure fibrillaire similaire à celle de l'os via la formation d'une phase cristal-liquide cholestérique nous semble être plus qu'une coïncidence. Il n'est pas absurde de penser que le procollagène, précurseur du collagène soluble en milieu physiologique, puisse lui aussi passer *in vivo* par un état de texture chirale régulière. En effet, mis à part les propeptides terminaux globulaires absents dans la molécule de collagène, le procollagène possède la même structure en hélice de la molécule qui lui confère aussi des propriétés cristallines liquides[7], même si des propriétés proprement chirales n'ont pas encore été mises en évidence.
Si l'hypothèse de l'existence du passage par une phase cholestérique *in vivo* est correcte, il faut imaginer que cette dernière se forme progressivement, par accrétions de zones plus diluées[8,9]. En effet, nous avons vu que les solutions denses de collagène pouvaient être extrêmement élastiques, ce qui pouvait donc limiter la mise en place de textures chirales régulières à longue portée. Les expériences en microchambres, où le milieu est sans cesse réapprovisionné en collagène dilué, sont en faveur d'un tel mécanisme.
Concernant la formation des fibrilles *in vivo*, la question de la régulation du diamètre reste ouverte. En effet, les édifices que nous avons observés sont très polydisperses en taille ; cette polydispersité est sans doute essentiellement due à des problèmes de manipulation. En revanche,

dans des systèmes confinés, non perturbés et régulièrement approvisionnés en collagène, comme dans les microchambres, la taille des fibrilles est plus homogène pour une concentration donnée. De même, les observations présentées ici montrent d'une part qu'à très forte densité la taille des fibrilles était mieux régulée et d'autre part que même à pH acide, des fibrilles pouvaient se former spontanément. Une telle mise en ordre progressive a été décrite pour le procollagène *in vivo*, en milieu suffisamment confiné, avant même le clivage des propeptides[10].

Outre ces effets purement physico-chimiques, il a déjà été largement démontré que d'autres molécules présentes *in vivo* participent à la mise en place et à la régulation des fibrilles[11-15] ; leur rôle sur l'organisation des phases denses de collagène *in vitro* est actuellement en cours au laboratoire[16]. Certes, nous ne méconnaissons pas les travaux de K. Kadler et de son équipe[17] sur l'extrusion des fibrilles par les fibripositors sans passage par une phase où le procollagène est dispersé en solution, mais ils n'expliquent pas encore l'organisation suprafibrillaire en contreplaqué spécifique de certains tissus. Il se peut d'ailleurs qu'il n'existe pas un mécanisme unique pour tous les tissus.

*

Finalement, nous aurons peu étudié l'influence de la chiralité de la triple hélice de collagène sur ses propriétés d'auto-assemblage alors même qu'il s'agit de l'une de ses caractéristiques les plus remarquables. En effet, la forte viscoélasticité des solutions nous a limité dans l'étude de la chiralité des phases cristal-liquides. Nous pourrions ainsi envisager d'étudier l'influence de différents paramètres physico-chimiques sur le pas de l'hélice, de sa conservation au sein des gels fibrillaires et de la discrétisation des orientations que cette dernière implique. En effet, la question est de savoir comment des molécules hélicoïdales tournant de façon continue au sein d'une phase cholestérique vont former des fibrilles discrètes conservant l'ultrastructure hélicoïdale. À un niveau plus local, le processus d'assemblage des hélices au sein d'une fibrille dans laquelle elles sont globalement alignées reste encore largement ignoré[18,19].

*

Enfin, la maîtrise de l'élaboration de matériaux denses et organisés à base de collagène laisse espérer différentes applications plus ou moins lointaines. La plus avancée est celle concernant leur utilisation en tant que matrice tridimensionnelle pour la culture cellulaire[20], puisque ce type de matrice est employé au sein de l'équipe[21-23]. Du point de vue des applications

biomédicales, nous pouvons envisager d'exploiter ces matériaux en tant qu'implant cutané ou osseux, ou en tant que vecteur pour le relargage médicamenteux[24]. Nous pourrions notamment exploiter la porosité variable observée dans nos gels fibrillaires pour de tels usages.

Références de la Conclusion

[1] Murthy N.S. "Liquid Crystallinity in Collagen Solutions and Magnetic Orientation of Collagen Fibrils" *Biopolymers* **23** (1984) 1261-1267

[2] Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen" *Biology of the Cell* **67** (1989) 97-101

[3] Hukins D.W.L. et Woodhead-Galloway J. "Collagen Fibrils as Examples of Smectic A Biological Fibres" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **41** (1977) 33-39

[4] Besseau L. et Giraud-Guille M.-M. "Stabilization of Fluid Cholesteric Phases of Collagen Phases to Ordered Gelated Matrices" *J. Mol. Biol.* **251** (1995) 197-202

[5] Mosser G., Anglo A., Helary C., Bouligand Y., Giraud-Guille M.-M. "Dense Tissue-like Collagen Matrices Formed in Cell-free Conditions" *Matrix Biol.* **25** (2006) 3-13

[6] Gardel M.L., Valentine M.T., Crocker J.C., Bausch A.R., Weitz D.A. "Microrheology of Entangled F-Actin Solutions" *Phys. Rev. Lett.* **91**:15 (2003) 158302

[7] Martin R., Farjanel J., Eichenberger D., Colige A., Kessler E., Hulmes D.J.S., Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Ordering of Procollagen as a Determinant of Three-Dimensional Extracellular Matrix Architecture" *J. Mol. Biol.* **301**:1 (2000) 11-17

[8] Neville A.C. "The Need for a Constraining Layer in the Formation of Monodomains Helicoids in a Wide Range of Biological Structures" *Tissue & Cell* **20** (1988) 133-143

[9] Belamie E., Mosser G., Gobeaux F., Giraud-Guille M.-M. "Possible Transient Liquid Crystal Phase During the Laying Out of Connective Tissues: α-Chitin and Collagen as Models" *J. Phys. Condens. Matter* **18** (2006) S115-129

[10] Leblond C.P. "Synthesis and Secretion of Collagen by Cells of Connective Tissue, Bone and Dentin" *The Anatomical Record* **224** (1989) 123-138

[11] Birk D.E. Type V Collagen: Heterotypic Type I/V Interactions in the Regulation of Fibril Assembly. *Micron* **32** (2001) 223–237.

[12] Chakravarti S., Magnuson T., Lass J.H., Jepsen K.J., LaMantia C., Carroll H. "Lumican Regulates Collagen Fibril Assembly: Skin Fragility and Corneal Opacity in the Absence of Lumican" *J. Cell Biol.* **141** (1998) 1277–1286.

[13] Chapman, J.A. "The Regulation of Size and Form in the Assembly of Collagen Fibrils in Vivo" *Biopolymers* **28** (1989) 1367–1382

[14] Weber I.T., Harrison R.W., Iozzo R.V. "Model Structure of Decorin and Implications for Collagen Fibrillogenesis" *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 31767–31770

[15] Graham H.K., Holmes D.F., Watson R.B., Kadler K.E. "Identification of Collagen Fibril Fusion during Vertebrate Tendon Morphogenesis. The Process Relies on Unipolar Fibrils and is Regulated by Collagen–Proteoglycan Interaction" *J. Mol. Biol.* **295** (2000) 891–902

[16] Mosser G., Hansen U., Anglo A., Pentrup G., Bruckner P.., Giraud-Guille M.-M. "The 3D Order of Dense Collagen Matrices Controlled Through Their Molecular Composition" (en préparation)

[17] Canty E.G., Lu Y., Meadows R.S., Shaw M.K., Holmes D.F., Kadler K.E. "Coalignement of Plasma Membrane Channels and Protrusions (Fibripositors) Specifies the Parallelism of Tendon" **165** 4 (2004) 553-563

[18] Lillie J.H., MacCallum D.K. Scalletta L.J., Occhino J.C. "Collagen Structure: Evidence for a Helical Organization of the Collagen Fibril" *J. Struct. Biol.* **58** (1977) 134-143

[19] Bouligand Y., Denefle J.-P., Lechaire J.-P., Maillard M.M. "Twisted Architecture in Cell-free Assembled Collagen Gels: Study of Collagen Substrates Used for Cultures" *Biol. Cell* **54** (1985) 143-162

[20] Chevallay B. et Herbage D. "Collagen-based Biomaterials as 3D Scaffold for Cell Cultures : Applications for Tissue Engineering and Gene Therapy" *Cellular Engineering: Tissue Engineering and Biomaterials* **38**:2 (2000) 211-218

[21] Hélary C., Ovtracht L., Coulomb B., Godeau G., Giraud-Guille M.-M. "Dense Fibrillar Collagen Matrices: A Model to Study Myofibroblast Behaviour During Wound Healing" *Biomaterials* **27**:25 (2006) 4443-4452

[22] Hélary C., Foucault-Bertaud A., Godeau G., Coulomb B., Giraud-Guille M.-M. "Fibroblast Populated Dense Collagen Matrices: Cell Migration, Cell Migration, Cell Density and Metalloproteinases Expression" *Biomaterials* **26**:13 (2005) 1533-1543

[23] Vigier S. (en préparation)

[24] De Paoli Lacerda S.H., Ingber B., Rosenzweig N. "Structure-release Rate Correlation in Gels Containing Fluorescent Drug Analog" *Biomaterials* **26** (2005) 7164-7172

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES FRÉQUEMMENT UTILISÉS.

a	Flexibilité (Chapitres 1 et 2)
β_1	Volume exclu
γ	Cisaillement
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement
δ	Différence de marche
δ	Incrément dans le diamètre effectif
η^*	Viscosité complexe
η_{app}	Viscosité apparente
2θ	Angle de diffusion de Bragg
$\varkappa^{-1}$	Longueur de Debye
λ	Longueur d'onde
ν	Densité linéique de charge
ν_{eff}	Densité linéique de charge effective
ξ	Longueur de corrélation
π	Pi = 3,1416…
σ	contrainte
ψ	Angle azimutal
ω	Pulsation ou fréquence
Γ	Constante d'exclusion de sel de Donnan
Φ	Fraction volumique
Ω	Angle solide
C^*	concentration d'enchevêtrement
°C	degré Celsius
c	concentration
c	célérité de la lumière dans le vide
D	Dalton
D	Diamètre d'une molécule (considérée comme un sphérocylindre ou un bâtonnet semi-flexible)
D	Décalage périodique de 67 nm observé dans les fibrilles de collagène
F	Energie libre
$\overline{G}$	Module de viscoélasticité complexe
G'	Module élastique (ou de conservation)
G''	Module visqueux (ou de perte)
k_B	constante de Boltzmann = $1{,}3806503\times10^{-23}$ $m^2.kg.s^{-2}.K^{-1}$
L	Longueur d'une molécule (considérée comme un sphérocylindre ou un bâtonnet semi-flexible)
M	molaire (mole/litre)
mM	millimolaire
N_a	nombre d'Avogadro = $6{,}0221415\times10^{23}$ mol^{-1}
n	indice de réfraction
n_o	indice ordinaire
n_e	indice extraordinaire
P	Longueur de persistance (définition page 19)
Q	Longueur de Bjerrum (= 0,714 nm dans l'eau à 25°C)
q	Module du vecteur de diffusion
r	Rayon
s	$s = q/2\pi$
T	température

T%	transmittance (% de lumière transmise)
v	vitesse de propagation de la lumière dans le milieu considéré
nm	nanomètre
m	mètre
dm	décimètre
µm	micron
Å	Angström

CL	Cristal-liquide
DMBA	Diméthyl Amino-4-Benzaldéhyde
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
HAP	Hydroxyapatite
PBLG	Poly-Benzyl-L-Glutamate
PBS	Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate)
PEG	Polyéthylène Glycol
SBF	Simulated Body Fluid (solution mimant la composition du plasma sanguin)
1,5-SBF	solution dont la composition est 1,5 × celle du plasma sanguin
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SAXS	Small Angle X-ray Scattering (diffusion des rayons X aux petits angles)
WAXS	Wide Angle X-ray Scattering (diffusion des rayons X aux grands angles)

INDEX ALPHABÉTIQUE DES RÉFÉRENCES CITÉES

Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. "Image Processing with ImageJ" *Biophotonics Int.* **11** (2004) 26-42

Addadi L., Moradian J., Shay E., Maroudas N. G., Weiner S. "A Chemical Model for the Cooperation of Sulfates and Carboxylates in Calcite Crystal Nucleation: Relevance to Biomineralization" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 2732-2736.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. "Molecular Biology of The Cell" 4ème Edition, Garland Science (2002)

Andre-Frei V., Chevallay B., Orly I., Boudeulle M., Huc A., Herbage D. "Acellular Mineral Deposition in Collagen-Based Biomaterials Incubated in Cell Culture Media" *Calcif-Tissue-Int.* **66** (2000) 204-211.

Barrat J.-L. et Joanny J.-F. "Theory of Polyelectrolyte Solutions" *Advance in Chemical Physics* **94** (1996) 1-66

Baselt D., Revel J., Baldeschwieler "Subfibrillar Structure of Type I Collagen Observed by Atomic Force Microscopy" *Biophys J.* **65** (1993) 2644-2655

Bawden F.C., Pirie N.W., Bernal J.D., Frankuchen I. "Liquid Crystalline Substances from Virus-infected Plants" *Nature* **138** (1936) 1051-1052

Bear R.S. "X-ray Diffraction Studies on Protein Fibers. I. The Large Fiber-Axis Period of Collagen" *J. Am. Chem. Soc.* **66** (1944) 1297-1305

Belamie E., Davidson P., Giraud-Guille M.M. "Structure and Chirality of the Nematic Phase in α-Chitin Suspensions" *J. Phys. Chem. B.* **108**:39 (2004) 14991-15000

Belamie E., Mosser G., Gobeaux F., Giraud-Guille M.-M. "Possible Transient Liquid Crystal Phase During the Laying Out of Connective Tissues : α-Chitin and Collagen as Models" *J. Phys. Condens. Matter* **18** (2006) S115-129

Bella J., Brodski B., Berman H.M. "Disrupted Collagen Architecture in the Crystal Structure of a Triple-Helical Peptide with a Gly→Ala Substitution" *Connect. Tissue Res.* **35**:1-4 (1996) 401-406

Bergman I. et Loxley R. "Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline" *R. Anal. Chem.* **35** (1963) 1961-1965

Berret J.-F., Roux D.C., Porte G. "Isotropic-to-Nematic Transition in Wormlike Micelles Under Shear" *Journal de Physique* **4**:8 (1994) 1261-1279

Berret J.-F., Roux D.C., Porte G. "Shear-Induced Isotropic-to-Nematic Phase-Transition in Equilibrium Polymers" *Europhysics Letters* **25**:7 (1994) 521-526

Berthod F., Germain L., Guignard R., Lethias C., Garrone R., Damour O., vander Rest M., Auger F.A. "Differential Expression of Collagens XII and XIV in Human Skin and in Reconstructed Skin" *J. Invest. Dermat.* **108** (1997) 737-742

Bertrand L. et Roubaud M. "L'Emploi du Microscope Polarisant", Ed. Lemarre J., Paris (1969)

Besseau L. & Giraud-Guille M.-M. "Stabilization of Fluid Cholesteric Phases of Collagen Phases to Ordered Gelated Matrices" *J. Mol. Biol.* **251** (1995) 197-202

Besseau L., Coulomb B., Godeau G., Lebreton-Decoster C., Giraud-Guille M.-M. "Production of Ordered Collagen Matrices for Three Dimensionnal Cell Culture" *Biomaterials* **23** (2002) 27-36

Bigi A., Burghammer M., Falconi R., Koch M.H.J., Panzavolta S., Riekel C. "Twisted Plywood Pattern of Collagen Fibrils in Teleost Scales: An X-ray Diffraction Investigation" *J. Struct. Biol.* **136** (2001) 137-143.

Birk D.E. "Type V Collagen : Heterotropic I/V Collagen Interactions in the Regulation of Fibril Assembly" *Micron* **32** (2001) 223-237

Birk D.E., Fitch J.M., Babiarz J.P., Doane K.J., Linsenmayer T.F. "Collagen Fibrillogenesis in Vitro: Interaction of Types I and V Collagen Regulates Fibril Diameter" *J. Cell Sci.* **95** (1990) 649-657

Bloom W. & Fawcett D.W. "A Textbook of Histology" 9th Edition Philadelphia: W.B. Saunders Company (1968) 780

Boedtker H. & Doty P. "A Study of Gelatin Molecules, Aggregates and Gels" *J. Phys. Chem.* **58** (1954) 968-983

Borsali R., Rinaudo M., Noirez L. "Light Scattering and Small-Angle Neutron Scattering from Polyelectrolyte Solutions: The Succinoglycan" *Macromolecules* **28** (1995) 1085-1088

Bouligand "Sur l'existence de « pseudomorphoses cholestériques » chez divers organismes vivants" *Journal de Physique* **11-12** tome 30 (1969) C4-90.

Bouligand Y. "Twisted Fibrous Arrangements in Biological Materials and Cholesteric Mesophases" *Tissue & Cell* **4**:2 (1972) 189-217.

Bouligand Y. "Two Superposed Fibre Diagrams in X-ray Diffraction Patterns of Collagen Tendons" (non publié)

Bouligand Y., Denefle J.-P., Lechaire J.-P., Maillard M.M. "Twisted Architecture in Cell-free Assembled Collagen Gels: Study of Collagen Substrates Used for Cultures" *Biol. Cell* **54** (1985) 143-162

Bourgine P. & Lesne A. (sous la direction de) "Morphogenèse – L'origine des formes" Ed. Belin (Paris), Collection Echelles (2006) p. 18

Bozec L., van der Heidjden G., Horton M."Collagen Fibrils: Nanoscale Ropes" *Biophys. J.* **92** (2007) 70-75

Bradt J.-H., Mertig M., Teresiak A., Pompe W. "Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation" *Chem. Mater.* **111** (1999) 2694-2701.

Bruns R.R., Hulmes D.J.S., Therrien S.F., Gross J. "Procollagen Segment-Long-Spacing Crystallites: Their Role in Collagen Fibrillogenesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** 1 (1979) 313-317

Byers P.H. "Folding Defects in Fibrillar Collagens" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **356** (2001) 151-158

Cabane B. & Hénon S. "Liquides – Solutions, dispersions, émulsions, gels" Ed. Belin (Paris), Collection Echelles (2003)

Canty E.G. & Kadler K.E. "Procollagen Trafficking, processing and Fibrillogenesis" *J. Cell. Science* **118** (2005) 1341-1353

Canty E.G., Lu Y., Meadows R.S., Shaw M.K., Holmes D.F., Kadler K.E. "Coalignement of Plasma Membrane Channels and Protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon" **165** 4 (2004) 553-563

Cassel J.C., Mandelkern L., Roberts, D.E. "The Kinetics of the Heat Precipitation of Collagen" *J. Amer. Leather Chem. Assoc.* **57** (1962) 556-575.

Chakravarti S., Magnuson T., Lass J.H., Jepsen K.J., LaMantia C., Carroll H. "Lumican Regulates Collagen Fibril Assembly: Skin Fragility and Corneal Opacity in the Absence of Lumican" *J. Cell Biol.* **141** (1998) 1277–1286.

Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. "Preparation of Intact Monomeric Collagen from Rat Tail Tendon and Skin and the Structure of the Non-helical Ends in Solutions" *J. Biol. Chem.* **251** 19 (1976) 6062-6067

Chapman J.A., Tzaphlidou M., Meek K.M., Kadler K.E. "The Collagen Fibril – A Model System for Studying the Staining and Fixation of a Protein" *Electron Microsc. Rev.* **3** (1990) 143-182

Chapman, J.A. "The Regulation of Size and Form in the Assembly of Collagen Fibrils in Vivo" *Biopolymers* **28** (1989) 1367–1382

Chapot D., Bocquet L. et Trizac E. "Electrostatic Potential Around Charged Finite Rodlike Macromolecules: Nonlinear Poisson-Boltzmann Theory" *Journal of Colloid and Interface Science* **285** (2005) 609-618

Chapot D., Bocquet L. et Trizac E. "Interaction Between Charged Anisotropic Macromolecules: Applications to Rodlike Polyelectrolytes" *J. Chem. Phys.* **120**:8 (2004) 3969-3982

Chen J., Burger C., Krishnan C.V., Chu B., Hsiao B.S., Glimcher M.J. "*In Vitro* Mineralization of Collagen in Demineralized Fish Bone" *Macromol. Chem. and Phys.* **206** (2005) 43-51.

Chen J.M., Kung C.E., Feairheller S.H., Brown E.M. "An Energetic Evaluation of a « Smith » Collagen Microfibril Model" *Journal of Protein Chemistry* **10**:5 (1991) 535-552

Chen Z.Y. "Nematic Ordering in Semiflexible Polymer Chains" *Macromolecules* **26** (1993) 3419-3423

Chernoff E.A.G. et Chernoff D.A. "Atomic Force Microscope Images of Collagen Fibres" *J. Vac. Sci. Technol.* **A10** (1992) 596-599

Chevallay B. & Herbage D. "Collagen-based Biomaterials as 3D Scaffold for Cell Cultures : Applications for Tissue Engineering and Gene Therapy" *Cellular Engineering: Tissue Engineering and Biomaterials* **38**:2 (2000) 211-218

Christensen R.G. et Cassel J.M. "Volume Change Accompanying Collagen Denaturation" *Biopolymers* **5** (1967) 685-689

Christiansen D.L., Huang E.K., Silver F.H. "Assembly of Type I Collagen : Fusion of Fibril Subunits and the Influence of Fibril Diameter on Mechanical Properties" *Matrix Biol.* **19** (2000) 409-420

Christoffersen J. & Landis W.J. "A Contribution with Review to the Description of Mineralization of Bone and and Other Calcified Tissues *In Vivo*" *The Anatomical Record* **230** 4 (1990) 435-450.

Cisneros D.A., Hung C., Franz C. M., Muller D. J., "Observing Growth Steps of Collagen Self-Assembly by Time-lapse High-resolution Atomic Force Microscopy" *J. Struct. Biol.* **154** (2006) 232-235

Claire K., Pecora R. "Translational and Rotational Dynamics of Collagen in Dilute Solution" *J. Phys. Chem.* **101** (1997) 746-753

Collings P.J. "Liquid Crystals: Nature's Delicate Phase of Matter" Second Edition (2001) Princeton University Press

Comper W.D. & Veis A.., "The Mechanism of Nucleation for in Vitro Collagen Fibrils Formation" *Biopolymers* **16** (1977) 2113-2131

Cooper A. "Thermodynamic Studies of the Assembly *in vitro* of Native Collagen Fibrils" *Biochem. J.* **118** (1970) 355-365

Couarraze G. & J.L. Grossiord, « Initiation à la Rhéologie », 2ème édition, Ed. Tec&Doc (Paris) (1991)

Coulombre J. & Coulombre A. "Corneal Development, Treatment of Five Day Old Embryos of Domestic Fowl with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON)" *Developmental Biology* **45** (19975) 291-303

Cowin S.C. "Do Liquid Crystal-like Flow Processes Occur in the Supramolecular Assembly of Biological Tissues?" *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* **119** (2004) 155-162

Cox W.P. & Merz E.H. "Correlation of Dynamic and Steady Viscosities" *J. Polym. Sci.* **28** (1958) 619-622

Davidson P., Petermann D., Levelut A.M. "The Measurement of the Nematic Order Parameter by X-ray Scattering Reconsidered" *J. Phys. II (France)* **5** 1 (1995) 113-131

De Gennes P.G. "Reptation of Polymer Chain in the Presence of Fixed Obstacles" *J. Chem. Phys.* **55**:2 (1971) 572-579

De Gennes P.G., Pincus P., Velasco R.M., Brochard F. "__" *J. Phys. (Paris)* **37** (1976) 1461-1473

De Paoli Lacerda S.H., Ingber B., Rosenzweig N. "Structure-release Rate Correlation in Gels Containing Fluorescent Drug Analog" *Biomaterials* **26** (2005) 7164-7172

Deyl Z., Mikšík, Eckhardt A. "Preparative Procedures and Purity Assessment of Collagen Proteins" *Journal of Chromatography B* **790** (2003) 245-275

Diamant J., Keller A., Baer E., Litt M., Arridge R.G.C. "Collagen: Ultrastructure and its Relation to Mechanical Properties as a Function of Ageing" *Proc. R. Soc. Lond. B* **180** (1972) 293-315

Djabourov M., Lechaire J.-P., Gaill F. "Structure and Rheology of Gelatin and Collagen Gels" *Biorheology* **30** (1993) 191-205

Dlugosz J., Gathercole L.J., Keller A. "Transmission Electron Microscope Studies and their Relation to Polarizing Optical Microscopy in Rat Tail Tendon" *Micron* **9** (1978) 71-82

Dogic Z. et Fraden S. "Ordered Phases of Filamentous Viruses" *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**:1 (2006) 47-55

Dogic Z. et Fraden S. "Smectic Phase in a Colloidal Suspension of Semiflexible Virus Particles" *Phys. Rev. Lett.* **78**:12 (1997) 2417-2420

Dogic Z., Purdy K.R., Grelet E., Adams M., Fraden S. "Isotropic-Nematic Phase Transition in Suspenions of Filamentous Virus and the Neutral Polymer Dextran" *Phys. Rev. E* **69** (2004) 051702

Doï S. & Edwards S.F. "Dynamic of Concentrated Polymer Systems" J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 **74** (1978) 1802-1817

Doï S. & Edwards S.F. "The Theory of Polymer Dynamics" Oxford University Press (1986)

Dorozhkin S.V. et Epple M. "Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41** (2002) 130–3146.

Doyle B.B., Hukins D.W., Hulmes D.J.S., Miller A., Woodhead-Galloway J. "Collagen Polymorphism: Its Origins in the Amino Acid Sequence" *J. Mol. Biol.* **91** (1975) 79-88

Duglosz J., Gathercole L.J., Keller A. "Transmission Electron Microscope Studies and Their Relation to Polarizing Optical Microscopy in Rat Tail Tendon" *Micron* **9** (1978) 71-82

Eglin D., Coradin T., Giraud-Guille M.-M., Hélary C., Livage J. "Collagen-silica Hybrid Materials: Sodium Silicate and Sodium Chloride Effects on Type I Collagen Fibrillogenesis" *Bio-medical Materials and Engineering* **15**:1-2 (2005) 43-50

Eglin D., Mosser G., Giraud-Guille M.-M., Livage J., Coradin T. "Type I Collagen, a Versatile Liquid Crystal Biological Template for Silica Structuration From Nano- to Microscopic Scales" *Soft Matter* **1**:2 (2005) 129-131

Engel J. et Prockop D.J. "The Zipper-like Folding of Collagen Triple Helices and the Effects of Mutations that Disrupt the Zipper" *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20** (1991) 137-152

Eyre D.R., Paz M.A., Gallop P.A. "Cross-Linking in Collagen and Elastin" *Annu. Rev. Biochem.* **53** 717-748

Falini G., Fermani S., Foresti E., Parma B., Rubini K., Sidoti M.C., Roveri N. "Films of Self-Assembled Purely Helical Type I Collagen Molecules" *J. Mat. Chem.* **14** (2004) 2297-2302

Feitosa V.L.C., Reis F.P., Esquisatto M.A.M., Joazeiro P.P., Vidal B.C., Pimentel E.R. "Comparative ultrastructural analysis of different regions of two digital flexor of tendon of pigs" *Micron* **37** (2006) 518-525

Fessler J.H. "Some Properties of Neutral-Salt Soluble Collagen. 2" *Biochem J.* **76** (1960) 463-471

Fincher C.R. "Field-Induced Textures and Elastic Constants of Nematic Polymers" *Macromolecules* **19** (1986) 2431-2435

Fitton-Jackson S. "The Fine Structure of Developing Bone in the Embryonic Fowl" *Proc. R. Soc. Ser. B* **146** (1957) 270-280.

Fletcher G.C. "Dynamic Light Scattering from Collagen Solutions. I. Translational Diffusion Coefficient and Aggregation Effects" *Biopolymers* **15**:11 (1976) 2201-2217

Font B., Aubert-Foucher E., Goldschmidt D., Eichenberger D., van der Rest M. "Binding of Collagen XIV with the Dermatan Sulfate Side Chain of Decorin" *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 25015-25018

Font B., Eichenberger D., Rosenberg L.M., van der Rest M. "Characterization of the Interactions of Type XII Collagen with Two Small Proteoglycans from Fetal Bovine Tendon, Decorin and Fibromodulin" *Matrix Biol.* **15** (1996) 341-348

Forgacs G., Newman S.A., Hinner B., Maier C.W., Sackmann E. "Assembly of Collagen Matrices as a Phase Transition Revealed by Structural and Rheological Studies" *Biophys. J.* **84** (2003) 1272-1280

Forgacs G., Newman S.A., Obukhov S.P., Birk D.E. "Phase Transition and Morphogenesis in a Model Biological System" *Phys. Rev. Lett.* **67**:17 (1991) 2399-2402

Freudenberg U., Behrens S.H., Welzel P.B., Müller M., Grimmer M., Salchert K., Taeger T., Schmidt K., Pompe W., Werner C. "Electrostatic Interactions Modulate the Conformation of Collagen I" *Biophysical Journal* **92** (2007) 2108-2119

Fried F. et Sixou P. "Bands and Torsads Textures in Films and Threads of Hydroxypropyl Cellulose" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **158B** (1988) 163-184

Gabriel J.-C.P. et Davidson P. New Trends in Colloïdal Liquid Crystals Based on Mineral Moieties" Advanced Materials 12:1 (2000) 9-20

Gabriel J.C.P., Sanchez C., Davidson P. "Observation of Nematic Liquid-Crystal Textures in Aqueous Gels of Smectite Clays" *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 11139-11143

Gale M., Pollanen M.S., Markiewicz P., Goh M.C. "Sequential Assembly of Collagen Revealed by Atomic Force Microscopy" *Biophys. J.* **68** (1995) 2124-2128

Gardel M.L., Valentine M.T., Crocker J.C., Bausch A.R., Weitz D.A. "Microrheology of Entangled F-Actin Solutions" *Phys. Rev. Lett.* **91**:15 (2003) 158302

Gehrke N., Nassif N., Pinna N., Antonietti, Gupta H.S., Cölfen H. "Retrosynthesis of Nacre via Amorphous Precursor Particles" *Chem. Mater.* **17** (2005) 6514-6516.

Gelman R.A. et Piez K.A. "Collagen Fibril Formation *in Vitro* – A Quasi-elastic Light-Scattering Study of Early Stages" *J. Biol. Chem.* **255**:17 (1980) 8098-8102

Gelman R.A., Williams B.R., Piez K.A., "Collagen Fibril Formation. Evidence for a Multistep Process", *J. Biol. Chem.* **254** 1 (1979) 180-186

Gelse K., Pöschl E., T. Aigner "Collagens—Structure, Function, and Biosynthesis" *Advanced Drug Delivery Reviews* **55** (2003) 1531– 1546

Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen" *Biology of the Cell,* **67** (1989) 97-101

Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystallinity in Condensed Type I Collagen Solutions – A Clue to the Packing of Collagen in Extracellular Matrices" *J. Mol. Biol.* **224** (1992) 861-873

Giraud-Guille M.-M. "Plywood Structure in Nature" *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **3** (1998) 221-227

Giraud-Guille M.-M. "Twisted Plywood Architecture of Collagen Fibrils in Human Compact Bone Osteons" *Calcif. Tissue Int.* **42** (1988) 167-180

Giraud-Guille M.-M. et Besseau L. "Banded Patterns in Liquid Crystalline Phases of Type I Collagen : Relationship with Crimp Morphology in Connective Tissue Architecture" *Connect. Tissue Res.* **37** (1997) 183-193

Giraud-Guille M.-M., Besseau L., Herbage D., Gounon P. "Optimization of Collagen Liquid Crystalline Assemblies: Influence of Sonic Fragmentation" *J. Struct. Biol.* **113** (1994) 99-106

Glimcher M.J. "Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation" *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* **64** (2006) 223-283

Glimcher M.J. "Molecular Biology of Mineralized Tissues with Particular Reference to Bone" *Rev. Mod. Phys.* 31 (1959) 359-393.

Glimcher M.J. et Muir H. "Recent Studies of the Mineral Phase in Bone and Its Possible Linkage to the Organic Matrix by Protein-Bound Phosphate Bonds (and Discussion)" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **304** (1984) 479-508.

Glimcher M.J., Hodge A.J., Schmitt F.O. "Macromolecular Aggregation States in Relation to Mineralization : The Collagen-Hydroxyapatite System as Studied In Vitro" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **43** (1957) 860-867

Graessley W.W. "The Entanglement Concept in Polymer Melts" *Adv. Polym. Sci.* **16** (1974) 1

Graham H.K., Holmes D.F., Watson R.B., Kadler K.E. "Identification of Collagen Fibril Fusion during Vertebrate Tendon Morphogenesis. The Process Relies on Unipolar Fibrils and is Regulated by Collagen–Proteoglycan Interaction" *J. Mol. Biol.* **295** (2000) 891–902

Grelet E., Fraden S. "What Is the Origin of Chirality in the Cholesteric Phase of Virus Suspensions ?" *Phys. Rev. Lett.* **90** 19 (2003) 198302-1

Groot L.C.A., Kuil M.E., Leyte J.C., Van Der Maarel J.R.C., Heenan R.K., King S.M., Jannick G. "Neutron Scattering Experiments on magnetically aligned crystalline DNA fragment solutions" *Liquid Crystals* **17** 2 (1994) 263-276

Gross J. & Kirk D., "The Heat Precipitation of Collagen from Neutral Salt Solution: Some Rate-Regulating Factors", *J. Biol. Chem.* **233** (1958) 355-360

Gross J., Highberger J.H., Schmitt F.O. "Collagen Structures Considered as States of Aggregation of a Kinetic Unit. The Tropocollagen Particle" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40** (1954) 679-688

Gross J., Highberger J.H., Schmitt F.O., "Extraction of Collagen from Connective Tissues by Neutral Salt Solutions" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41** (1955) 1

Hagenbüchle M., Weuerich B., Deggelmann M., Graf C., Krause R., Maier R.R., Schulz S.S., Klein R., Weber R. "Static Light Scattering by Aqueous Solutions of Rodlike fd-Virus Particles" *Physica A* **169** (1990) 29-41

Han W.H. et Rey A.D. "Theory and Simulation of Optical Banded Textures of Nematic Polymers during Shear Flow" *Macromolecules* **28** (1995) 8401-8405

Harris A.B., Kamien R.D., Lubensky T.C. "Microscopic Origin of Cholesteric Pitch" *Phys. Rev. Lett.* **78**:8 (1997) 1476-1479 + erratum: *Phys. Rev. Lett.* **78**:14 (1997) 286

Heaps P.W., Johnson P., Stainby G. "Partial Specific Wolumes of Solubilized Collagens and their Derived Gelatins" *Nature* **209** (1966) 397-398

Helary C. "Matrices Denses de Collagène pour l'Ingénierie Tissulaire : Structure et Colonisation par des Fibroblastes Dermiques Humains" Mémoire de diplôme d'ingénieur CNAM, Paris (2003)

Hélary C., Foucault-Bertaud A., Godeau G., Coulomb B., Giraud-Guille M.-M. "Fibroblast Populated Dense Collagen Matrices: Cell Migration, Cell Migration, Cell Density and Metalloproteinases Expression" *Biomaterials* **26**:13 (2005) 1533-1543

Hélary C., Ovtracht L., Coulomb B., Godeau G., Giraud-Guille M.-M. "Dense Fibrillar Collagen Matrices: A Model to Study Myofibroblast Behaviour During Wound Healing" *Biomaterials* **27**:25 (2006) 4443-4452

Helfer H., Panine P., Carlier M.-F., Davidson P. "The Interplay between Viscoelastic and Thermodynamic Properties Determines the Birefringence of F-Actin Gels" *Biophys. J.* **89** (2005) 543-553

Helseth Jr. D.L. et Veis A. "Collagen Self-Assembly *in Vitro*: Differentiating Specific Telopeptide-Dpendent Interactions Using Selective Enzyme Modification and the Addition of Free Amino Telopeptides" *J. Biol. Chem.* **256** (1981) 7118-7128

Hodge A.J. & Schmitt F.O. "Interaction Properties of Sonically Fragmented Collagen Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (1958) 318-424

Hodge A.J. et Petruska J.A. "Recent Studies with the Electron Microscope on Ordered Aggregates of the Tropocollagen Macromolecules" in: Aspects of Protein Structure (ed. Ramachandran G.N.) Academic Press, New-York (1963) 289-300

Hofmann H., Fietzek P.P., Kühn K. "The Role of Polar and Hydrophobic Interactions for the Molecular Packing of Type I Collagen: A Three-dimensional Evaluation of the Amino Acid Sequence" *J. Mol. Biol.* **125**:2 (1978) 137-165

Hofmann H., Voss T., Kühn K., Engel, J. "Localization of Flexible Sites in Thread-like Molecules from Electron Micrographs Comparison of Interstitial, Basement Membrane and Intima Collagens" *J. Mol. Biol.* **172** (1984) 325-343

Hsu S., Jamieson A.M., Blackwell J. "Viscoelastic Studies of Extracellular Matrix Interactions in a Model Native Collagen Gel System" *Biorheology* **31**:1 (1994) 21-36

Hukins D.W.L. & Woodhead-Galloway J. "Collagen Fibrils as Examples of Smectic A Biological Fibres" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **41** (1977) 33-39

Hukins D.W.L. & Woodhead-Galloway J. "Liquid-Crystal Model for the Organization of Molecules in Collagen Fibrils" *Biochemical Society Transactions* 572ème Meeting (1978) 238-239

Hulmes D.J.S. "Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures" *J. Struct. Biol.* **137** (2002) 2-10

Hulmes D.J.S. et Miller A. "Quasi-hexagonal Molecular Packing in Collagen Fibrils" *Nature* **282** (1979) 878-880

Hulmes D.J.S., Kadler K.E., Mould A.P., Hojima Y., Holmes D.F., Cummings C., Chapman J.A., Prockop D.J. "Pleomorphism in Type I collagen Fibrils Produced by Persistence of the Procollagen N-Propeptide" *J. Mol. Biol.* **210** (1989) 337-345

Hulmes D.J.S., Miller A., Parry D.A.D., Piez K.S, Woodhead-Galloway J. "Analysis of the Primary Structure of Collagen for the Origin of Molecular Packing" *J. Mol. Biol* **79** (1973) 137-148

Jackson D.S. et Fessler J.H. "Isolation and Properties of a Collagen Soluble in Salt Solution at Neutral pH" *Nature* **176** (1955) 69-70

Jäger I. et Fratzl P. "Mineralized Collagen Fibrils: A Mechanical Model with a Staggered Arrangement of Mineral Particles" *Biophys. J.* **79** (2000) 1737-1746.

Jelinski L.W., Sullivan C.E. et Torchia D.A. "^{2}H NMR Study of Molecular Motion in Collagen Fibrils" *Nature* **284** (1980) 531-534

Jiang F., Horber H., Howard J., Muller D.J. "Assembly of Collagen into Microribbons: Effects of pH and Electrolytes" *J. Struct. Biol.* **148** (2004) 268–278.

Kadler K.E. & Chapman J.A., "An Electron Microscope Study of the First-Formed Aggregates in Collagen Fibril Assembly *in Vitro*" *Ann. NYAS* **460** (1985) 456-460

Kadler K.E. "Assembly of Collagen Fibrils *de Novo* of the Type I pC-Collagen with Procollagen C-proteinase. Assay of Critical Concentration Demonstrates that Collagen Self-Assembly is a Classical Example of an Entropy-Driven Process" *J. Biol. Chem.* **262**:32 (1987) 15696-15701

Kadler K.E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R.P. "Collagens at a Glance" *J. Cell Science* **120** (2007) 1955-1958

Kadler K.E., Hojima Y., Prockop D.J. "Assembly of Collagen Fibrils de Novo Cleavage of the Type I pC-Collagen with Procollagen C-Proteinase" *J. Biol. Chem.* **260** : 32 (1987) 15696-15701

Kadler, K.E. "Learning How Mutations in Type I Collagen Genes Cause Connective Tissue Disease" *Int. J. Exp. Pathol.* **74** 319–323 (1993)

Kale J. & Darwin J. "Modified Procedure for assay of H3- or C14-labeled Hydroxyproline" *Analytical Biochemistry* **15** (1965) 77-83

Keates P., Mitchell G.R., Peuvrel E. "Local Structural Correlations in Anisotropic Solutions of Hydroxypropylcellulose" *Polymer* **33** (1992) 3298-3301

Khokhlov A.R. & Semenov A.N. "Liquid-Crystalline Ordering in Solutions of Semiflexible Macromolecules with Rotational-Isomeric Flexibility" *Macromolecules* **17** (1984) 2678-2685

Khokhlov A.R. et Semenov A.N. "Liquid-crystalline Ordering in the Solution of Partially Flexible Macromolecules" *Physica A* **112** (1982) 605-614

Kikuchi M., Itoh S., Ichinose S., Shinomiya K., Tanaka J. "Self-organization Mechanism in a Bone-like Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Synthesized *in Vitro* and its Biological Reaction *in Vivo*" *Biomaterials* **22** (2001) 1705-1711.

Kiss G. et Porter R.S. "Rheo-Optical Studies of Liquid Crystalline Solutions of Helical Polypeptides" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **60** (1980) 267-280

Kléman M. et Lavrentovitch O.D. "Soft Matter Physics: An Introduction", Springer Verlag (2002)

Kokubo T. "Bioactive Glass Ceramics: Properties and Applications." *Biomaterials* **12** (1991) 155-163.

Kokubo T. et Hiroaki Takadama "How Useful is SBF in Predicting *in Vivo* Bone Bioactivity?" *Biomaterials* **27** (2006) 2907-2915.

Komsa-Penkova R., Koynova R., Kostov G., Tenchov B. "Discrete Reduction of Type I Collagen Thermal Stability Upon Oxidation" *Biophysical Chemistry* **83** (1999) 185-195

Kornyshev A.A. et Leikin S. "Theory of Interaction Between Helical Molecules" *J. Chem. Phys.* **107**:9 (1997) 3656-3674

Kornyshev A.A. et Leikin S. "Twist in Chiral Interaction between Biological Helices" *Phys. Rev. Lett.* **84**:11 (2000) 2537-2540

Köster S., Leach J.B., Struth B., Pfohl T., Wong J.Y. "Visualization of Flow-Aligned Type I Collagen Self-Assembly in Tunable pH Gradients" *Langmuir* **23**:2 (2007) 357-359

Kuivaniemi H., Tromp G., Prockop D.J. "Mutations in Collagen Genes: Causes of Rare and Some Common Diseases in Humans" *FASEBS J.* **5** (1991) 2052-2060

Kuznetsova N., Leikin S. "Does the Triple Helical Domain of Type I Collagen Encode Molecular Recognition and Fiber Assembly while Telopeptides Serve as Catalytic Domains ?" *J. Biol. Chem.* **274** 51 (1999) 36083-36088

Laemmli, U.K. "Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of Bacteriophage T4" *Nature* **227** (1970) 680-685

Lalmas H. "Auto-assemblage de Collagène de type I – Caractéristiques Rhéophysiques" Mémoire de stage de Maîtrise de Chimie Physique, Université Pierre et Marie Curie (2004)

Landis W.J. et Hodgens K.J. "Mineralization of Collagen May Occur on Fibril Surfaces: Evidence from Conventional and High-Voltage Electron Microscopy and Three Dimensional Imaging" *J. Struct. Biol.* **117** (1996) 24-35.

Lapointe J., Marvin D.A. "Filamentous Bacterial Viruses: 8. Liquid-crystals of Fd" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **19** (1973) 269

Larson R.G. "The Structure and Rheology of Complex Fluids", Oxford University Press, New York (1998)

Leblond C.P. "Synthesis and Secretion of Collagen by Cells of Connective Tissue, Bone and Dentin" *The Anatomical Record* **224** (1989) 123-138

Leikin S., Rau D.C., Parsegian V.A. "Direct Measurement of Forces Between Self-assembled Proteins. Temperature-dependent Exponential Forces Between Collagen Triple Helices" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 276-280

Leikin S., Rau D.C., Parsegian V.A. "Temperature-favoured Assembly of Collagen is Driven by Hydrophilic not Hydrophobic Interactions" *Nat. Struct. Biol.* **2** 3 (1995) 205-210

Leikina E., Mertts M.V., Kuznetsova N., Leikin S. "Type I Collagen is Thermally Unstable at Body Temperature." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99** 3 (2002) 1314-1318

Lemaire B.J., Davidson P., Ferré J., Jamet J.P.; Panine P., Dozov I., Jolivet J.P. "Outstanding Magnetic Properties of Nematic Suspensions of Goethite (α-FeOOH) Nanorods" *Physcial Review Letters* **88**:12 (2002) 125507-1

Lillie J.H., MacCallum D.K. Scalletta L.J., Occhino J.C. "Collagen Structure: Evidence for a Helical Organization of the Collagen Fibril" *J. Struct. Biol.* **58** (1977) 134-143

Livolant F. "Cholesteric Organization of DNA in vivo and in vitro" *Eur. J. Cell Biol.* **33** (1983) 300-311

Livolant F. "Ordered Phases of DNA in vivo and in vitro" *Physica A* **176** (1991) 117-137

Livolant F. "Precholesteric Liquid Crystalline States of DNA" *J. Physique* **48** (1987) 1051-1066

Lonberg F., Fraden S., Hurd A.J., Meyer R.E. "Field-Induced Transient Periodic Structures in Nematic Liquid Crystals: The Twist-Fréedericksz Transition" *Phys. Rev. Lett.* **52**:21 (1984) 1903-1906

Long C.G., Braswell E., Zhu D., Apigo J., Baum J., Brodski B. "Characterization of Collagen-like Peptides Containing Interruptions in the Repeating Gly-X-Y Sequence" *Biochemistry* **32**:43 11688-11695

Maeda H. "An Atomic Force Microscopy Study of Ordered Molecular Assemblies and Concentric Ring Patterns from Evaporating Droplets of Collagen Solutions" *Langmuir* **15** (1999) 8505-8513

Maeda H. "Observation of Spatially Rythmic Patterns from Evaporating Collagen Solution Droplets" *Langmuir* **16** (2000) 9977-9982

Maggs A.C. "Two Plateau Moduli for Actin Gels" *Phys. Rev. E* 55:6 (1997) 7396-7400

Maier E.E., Krause R., Deggelmann, Hagenbüchle, Weber R., Fraden S. "Liquidlike Order of Charged Rodlike Particle Solution" *Macromolecules* **25** (1992) 1125-1133

Majewska M.R., Dancewicz A.M. "Molecular Parameters of Radiation-Induced Collagen Aggregates" *Stud. Biophys.* **63** (1977) 65-74

Martin R. "Les Propriétés d'Assemblages Cristallins Liquides du Procollagène" Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (1999)

Martin R. Farjanel J., Eichenberger D., Colige A., Kessler E., Hulmes D.J.S., Giraud-Guille M.-M. "Liquid Crystalline Ordering of Procollagen as a Determinant of Three-Dimensional Extracellular Matrix Architecture" *J. Mol. Biol.* **301**:1 (2000) 11-17

Martinot F. "Précipitation de Phosphate de Calcium dans des Matrices Organiques Biomimétiques" Rapport de stage de Master 1 Université Paris 7 Denis Diderot. (2006)

McPherson J.M., Wallace D.G., Sawamura S.J., Conti A., Condell R.A., Wade S., Piez K.A. "Collagen Fibrillogenesis *In Vitro*: A Characterization of Fibril Quality as a Function of Assembly Conditions" *Collagen Rel. Res.* **5** (1985) 119-135

Meek K.M. et Fullwood N.J. "Corneal and Scleral Collagens – a Microscopist's Perspective" *Micron* **32** (2001) 261-272

Michot L.J., Bihannic I., Maddi S., Funari S.S., Baravian C., Levitz P., Davidson P. "Liquid-crystalline aqueous clay suspensions" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103** 44 (2006) 16101-16104

Milas M., Rinaudo M., Knipper M., Schuppiser J.-L. "Flow and Viscoelastic Properties of Xanthan Gum Solutions" *Macromolecules* **23** (1990) 2506-2511

Miller A. et Parry D.A.D. "Structure and Packing of Microfibrils in Collagen" *J. Mol. Biol.* (1973) 441-447

Mitov M. "Les Cristaux Liquides", PUF, Collection Que Sais-je ? (1998)

Miyahara M., Hayashi K., Berger J., Tanzawa K, Njieha F.K., Trelstad R.L., Prockop D.J. "Formation of Collagen Fibrils by Enzymic Cleavage of Precursors of Type I Collagen *In Vitro*" *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 9891-9898

Mosser G., Anglo A., Helary C., Bouligand Y., Giraud-Guille M.-M. "Dense Tissue-like Collagen Matrices Formed in Cell-free Conditions" *Matrix Biol.* **25** (2006) 3-13

Mosser G., Hansen U., Anglo A., Pentrup G., Bruckner P.., Giraud-Guille M.-M. "The 3D Order of Dense Collagen Matrices Controlled Through Their Molecular Composition" (en préparation)

Mottes M., Gomez Lira M., Zolezzi F., Valli M., Lisi V., Freising P. "Four New Cases of Lethal Osteogenesis Imperfecta due to Glycine Substitutions in COL1A1 and Genes" *Hum. Mutat.* **12**:1 (1998) 71-72

Murthy N.S. "Liquid Crystallinity in Collagen Solutions and Magnetic Orientation of Collagen Fibrils" *Biopolymers* **23** (1984) 1261-1267

Myllyharju J. et Kiviriko K.I. "Collagens and Collagens-related Diseases" *Ann. Med.* **33** 7-21 (2001)

Na G.C., Phillips L.J., Freire E.I. "*In Vitro* Collagen Fibril Assembly: Thermodynamic Studies" *Biochemistry* **28** (1989) 7153-7161

Nageotte J. "Action des Sels Neutres sur la Formation du Caillot Artificiel de Collagène" *C. R. Soc. Biol.* (Paris) **96** (1927) 828

Narasaraju T.S.B. et Phebe D.E. "Some Physico-Chemical Aspects of Hydroxylapatite" *J. Mat. Sci.* **31** (1996) 1-21

Narayanan T., Diat O., Bösecke P. "SAXS and USAXS on the High Brilliance Beamline at the ESRF" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **467-468** (2001) 1005-1009

Nestler F.H.M., Hvidt S., Ferry J. D, Veis A.D. "Flexibility of Collagen Determined from Dilute Solution Viscoelastic Masurements" *Biopolymers* **22** (1983) 1747-1758

Neville A.C. "The Need for a Constraining Layer in the Formation of Monodomains Helicoids in a Wide Range of Biological Structures" *Tissue & Cell* **20** (1988) 133-143

Newman S., Cloître M., Allain C., Forgacs G. et Beyens D. "Viscosity and Elasticity During Collagen Assembly In Vitro: Relevance to Matrix-Driven Translocation" *Biopolymers* **41** (1997) 337-347

Newman S.A.; Forgacs G., Hinner B., Maier C.W., Sackmann E. "Phase Transformation in a Model Mesenchymal Tissue" *Physical Biology* **1** (2004) 100-109

Nishihara T. et Doty P. "The Sonic Fragmentation of Collagen Macromolecules" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (1958) 411-417

Olague-Marchan M., Twining S.S., Hacker M.K., McGrath J.A., Diaz L.A., Giudice G.J. "A Disease-associated Glycine Substitution in BP180 (type XVII) Leads to a Local Destabilization of the Major Collagen Triple Helix" *Matrix Biol.* **19** (2000) 223-233

Oldenbourg R., Wen X., Meyer R.B., Caspar D.L.D. "Orientational Distribution Function in Nematic Tobacco-Mosaic-Virus Liquid Crystals Measured by X-ray Diffraction" *Phys. Rev. Lett.* **61**:16 (1988) 18-51-1854

Onsager L. "The Effects of Shape on the Interaction of Colloidal Particle" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 627-659

Oodijk T. "Pitch of a Polymer Cholesteric" *J. Phys. Chem.* **91**:23 (1987) 6060-2

Orgel J.P.O "Microfibrillar Structure of Type I Collagen In Situ" *Proc. Natl. Acad. USA.* (2006) **103**

Orgel J.P.R.O., Miller A., Irving T.C., Fischetti R.F., Hammersley A.P., Wess T.J. "The In Situ Supermolecular Structure of Type I Collagen" *Structure* **9** (2001) 1061-1069

Orts W.J., Godbout L., Marchessault R.H., Revol J.-F. "Enhanced Ordering of Liquid Crystalline Suspensions of Cellulose Microfibrils: A Small Angle Neutron Scattering Study" *Macromolecules* **31** (1998) 5717-5725

Ostwald W. "Über die Geschwindigkeitsfunktion in der Viskosität disperser Systeme-117" *Kolloid Zeitschrift* **36** (1925) 99

Ottani V., Martini D., Franchi M., Ruggeri A., Raspanti M. "Hierarchical Structures in Fibrillar Collagens" *Micron* **33** (2002) 587-596

Paige M.F., Rainey J.K., Goh M.C. "Fibrous Long Spacing Collagen Ultrastructure Elucidated by Atomic Force Microscopy" *Biophys. J.* **74** (1998) 3211-3216

Panine P., Gradzielski et Narayanan T. "Combined Rheometry and Small-Angle X-ray Scattering" *Rev. Sci. Instrum.* **74**:4 (2003) 2451-2455

Papon P., Leblond J., Meijer P.H.E. "The Physics of Phase Transitions – Concept and Applications" Chapitre 6: Gelation and Transition in Biopolymers, Springer-Verlag (2002) p. 197

Parry D.A.D. "The Molecular and Fibrillar Structure of Collagen and its Relationship to the Mechanical Properties of Connective Tissue" *Biophysical Chemistry* **29** (1988) 195-209

Parry D.A.D., Flint M.H., Gillard G.C., Craig A.S. "A Role for Glycosaminoglycans in the Development of Collagen Fibrils" *FEBS Letters* **149** (1982) 1-7

Pelletier O., Bourgaux C., Diat O., Davidson P., Livage J. "A Biaxial Nematic Gel Phase in Aqueous Vanadium Pentoxide Suspensions" *European Physical Journal B* **12** :4 (1999) 541-546

Pelletier O., Davidson P., Bourgaux C., Livage J. "The Effects of Attractive Interactions on the Nematic Order of V_2O_5 Gels" *Europhysics Letters* **48**:1 (1999) 53-59

Perham R.N. "Self-Assembly of Biological Macromolecules" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **272** (1975) 123-136

Persikov A. V. et Brodsky B. "Unstable Molecules Form Stable Tissues" *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**:3 (2002) 1101–1103

Peterlik H., Roschger P., Klaushofer K., Fratzl P. "From Brittle to Ductile Fracture of Bone" *Nature Materials* **5** (2006) 52-55

Piez K.A. et Trus B. "A New Model for Packing of Type-I Collagen Molecules in the Native Fibrils" **1**:10 (1981) *Bioscience Reports* 801-810

Pins G.D., Christiansen D.L., Patel R., Silver F.H. "Self-assembly of collagen fibers: influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties" *Biophys. J.* **73** (1997) 2164-2172

Porter K.R. & Pappas G.D. "Collagen Formation by Fibroblasts of the Chick Embryo Dermis" *J. Cell Biol.* **5** (1959) 153-165

Prockop D.J. & Kiriviko K.I. "Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy" *Annu. Rev. Biochem.* **64** (1995) 403-434

Prockop D.J. "What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it?" *Matrix Biol.* **16** 519-528 (1998)

Prost J., De Gennes P.G., "The Physics of Liquid Crystals" Oxford University Press, 2nd Edition (1993)

Purdy K. & Fraden S. "Isotropic-cholesteric Phase Transition of Filamentous Virus Suspensions as a Function of Rod Length and Charge" *Physical Review E* **70** (2004) 061703

Purdy K.R., Dogic Z., Fraden S., Rühm A., Lurio L., Mochrie S.G.J "Measuring the nematic order of suspensions of colloidal fd virus by x-ray diffraction and optical birefringence" *Phys. Rev. E* **67** (2003) 031708

Purdy K.R., Varga S., Galindo A., Jackson G. Fraden S. "Nematic Phase Transitions in Mixtures of Thin and Thick Colloidal Rods" *Phys. Rev. Lett.* **94**:5 (2005) 057801/1-4

Quantock A.J. et Meek K.M. "Axial Electron Density of Human Scleral Collagen – Location of Proteoglycans by X-Ray Diffraction" *Biophys. J.* **54** (1988) 159-164

Ramachandran G.N. & Kartha G. "Structure of Collagen" *Nature* **174** (1954) 269-270

Ramachandran G.N. "Treatise on Collagen" vol 1 Academic Press New York (1967) 103-183

Revenko I., Sommer F., Minh D.T., Garrone R., Franc J. "Atomic Force Microscopy Study of the Collagen Fibre Structure" *Biol. Cell.* **80** (1994) 67-69

Revol J.-F. & Marchessault R.H. "*In vitro* Chiral Nematic Ordering of Chitin Crystallites" *Int. J. Biol. Macromol.* **15** (1993) 329-335

Revol J.-F., Bradford H., Giasson J., Marchessault R.H., Gray D.G. "Helicoidal Self-ordering of Cellulose Microfibrils in Aqueous Suspensions" *Int. J. Biol. Macromol.* **14** (1992) 170-172

Ricard-Blum S. & Ville G. "Collagen Cross-linking" *Int. J. Biochem.* **21** 11 (1989) 1185-1189

Ricard-Blum S., Ruggiero F., van der Rest "The Collagen Superfamily" *Collagen Topics in Current Chemistry* **247** (2005) 35-84

Rice R.V. "Reappearance of Certain Structural Features of Native Collagen after Thermal Transformation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **46** (1960) 1186-1194

Rice R.V., Casassa E.F., Kerwin R.E., Maser M.D. "On the Length and Molecular Weight of Tropocollagen from Calf Skin" *Arch. Biochem. Biophys.* **105** (1964) 409-423

Rich A. & Crick F.H.C. "The Molecular Structure of Collagen" *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 483-506.

Ripamonti A., Roveri N., Braga D., Hulmes D.J.S., Miller A., Timmins P.A. "Effects of pH and Ionic Strength on the Structure of Collagen Fibrils" *Biopolymers* **19** (1980) 965-975

Robins S.P., Shimokomaki M., Bailey A.J. "The Chemistry of Collagen Cross-Links: Age-related Changes in the Reducible Components of Intact Bovine Collagen Fibres" *Biochem J.* **131** (1973) 771-780

Romo-Uribe A. "On the Molecular Orientation and Viscoelastic Behaviour of Liquid Crystalline Polymers: the Influence of Macromolecular Architecture" *Proc. R. Soc. Lond. A* **457** (2001) 207-229

Ronzière M.-C., Berthet-Colominas C., Herbage D. "Comparative Structural Studies of Reconstituted and Native Type I and Type II Collagen Fibrils by Low-Angle X-ray Diffraction" *Biochimica et Biophysica Acta* **916** (1987) 381-387

Rouse P.E. "A Theory of the Linear Viscoelastic Properties of Dilute Solutions of Coiling Polymers" *J. Chem. Phys.* **21**:7 (1953) 1272-1280

Sadoc J.F. et Rivier N. "Boerdijk-Coxeter Helix and Biological Helices" *Eur. Phys. J. B* **12** (1999) 309-308

Saito, T., Iso N., Mizuno H., Onda N., Yamato H., Odashima, H. "Semiflexibility of Collagens in Solution" *Biopolymers* **21** (1982) 715-728

Sanchez C., Arribart H., Giraud-Guille M.-M., "Biomimetism and Bioinspiration as Tools for the Design of Innovative Materials and System" *Nature Materials* **4** (2005) 1-12.

Sasaki N., Shiwa S., Yagihara S., Hikichi K. "X-ray Diffraction Studies on the Structure of Hydrated Collagen" *Biopolymers* **22** (1983) 2539-2547

Sato T. et Teramoto A. "Pertubation Theory of Isotropic-Liquid-Crystal Phase Equilibria in Polyelectrolyte Solutions" *Physica A* **176** (1991) 72-86

Schmitt F.O. "Interaction Properties of Elongate Protein Macromolecules with Particular Reference to Collagen (Tropocollagen)" *Reviews of Modern Physics* **31**:2 (1959) 349-358

Scott J.E. "Proteoglycan-Fibrillar Collagen Interactions" *Biochem J.* **252** (1988) 313-323

Shnyrov V.L., Lubsandorzhieva V.Ch., Zhadan G.G., Permyakov E.A. "Multi-stage Nature of the Thermal Denaturation Process in Collagen" *Biochemistry International* **26**:2 (1992) 211-217

Silver F.H. & Trelstad R.L. "Type I Collagen in Solution – Structure and Properties of Fibril Fragments" *J. Biol. Chem.* **255**:19 (1980) 9427-9433

Silver F.H. "Type I Collagen Fibrillogenesis *in Vitro* – Additional Evidence for the Assembly Mechanism" *J. Biol. Chem.* **256**:10 (1981) 4973-4977

Silver F.H., Freeman J.W., Seehra G.P. "Collagen Self-Assembly and the Development of Tendon Mechanical Properties" *J. Biomech.* **36** (2003) 1529-1553

Smith J.W. "Molecular Pattern in Native Collagen" *Nature (London)* **219** (1968) 157-158

Straley J.P. "Frank Elastic Constants of the Hard-rod Liquid Crystal" *Phys. Rev. A* **8**:4 (1973) 2181-3

Straley J.P. "Theory of Piezoelectricity in Nematic Liquid Crystals, and of the Cholesteric Ordering" *Phys. Rev. A* **14**:5 (1976) 1835-41

Stroobants A., Lekkerkerker H.N.W., Odijk Th., "Effect of Electrostatic Interaction on the Liquid Crystal Phase Transition in Solutions of Rodlike Polyelectrolytes" *Macromolecules* **19** (1986) 2232-2238

Suarez, G.; Oronsky, A. L.; Bordas, J.; Koch, M. H. J. "Synchrotron Radiation X-ray Scattering in the Early Stages of *in vitro* Collagen Fibril Formation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** (1985) 4693-4696

Sun Y.-L., Luo Z.-P., Fertala A., An K.-N., "Direct Quantification of the Flexibility of Type I Collagen Monomer" *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 295 (2002) 382-386

Suzuki A., Maeda T., Ito T. "Formation of Liquid Crystalline Phase of Actin Filament Solutions and its Dependence on Filament Length as Studied by Optical Birefringence" *Biophys. J.* **59** (1991) 25-30

Takahashi-Iñiguez Y., Hélary C., Ramtani S., Geiger D., Giraud-Guille M.-M. "Unconfined Compression Behaviour of Dense Fibrillar Collagen Matrices Mimetic of Living Tissue" (en préparation)

Tang J. & Fraden S. "Nonmonotonic Temperature Dependence of the Flexibility of Bacteriophage fd" *Biopolymers* **39**:1 (1996) 13-22

Tang J.X. et Fraden S. "Isotropic-cholesteric Phase-transition in Colloidal Suspensions of Filamentous Bacteriophage fd" *Liq. Cryst.* **19** (1995) 459-467

Tanzer M.L. "Cross-Linking of Collagen" *Science* **190**:4086 (1973) 561-566

Thomas J.C. & Fletcher G.C. "Dynamic Light Scattering from Collagen Solutions. II. Photon Correlation Study of the Depolarized Light" *Biopolymers* **15**:11 (1976) 2201-2217

Tombolato F., Ferrarini A., Grelet E. "Chiral Nematic Phase of Suspensions of Rodlike Viruses: Left-Handed Phase Helicity from a Right-Handed Molecular Helix" *Phys. Rev. Lett.* **96**:25 (2006) 258302

Torbet J., Ronzière M.-C. "Magnetic Alignment of Collagen during Self-assembly" *Biochem. J.* **219** (1984) 1057-1059

Torchia D.A. et Vanderhart D.L. "^{13}C Magnetic Resonance Evidence for Anisotropic Molecular Motion in Collagen Fibrils" *J. Mol. Biol.* **104** (1976) 315-321

Torchia D.A., Hiyama Y., Sarkar S.E. et Sullivan C.E. "Multinuclear Magnetic Resonance Studies of Collagen Molecular Structure and Dynamics" *Biopolymers* **24** (1985) 65-75

Traub W., Arad T., Weiner S. " Three-dimensional Ordered Distribution of Crystals in Turkey Tendon Collagen Fibers" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 9822-9826.

Trelstad R. L., Hayashi K., Gross J. "Collagen Fibrillogenesis: Intermediate Aggregates and Suprafibrillar Order" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976) 4027-4031

Tsuprun V. et Santi P. "Crystalline Arrays of Proteoglycanes and Collagen in the Tectorial Membrane" *Matrix Biol.* **15** (1996) 31-38

Utiyama H., Sakato K., Ikehara T., Setsuiye T., Kurata M. "Flexibility of Tropocollagen from Sedimentation and Viscosity" *Biopolymers* **12** (1973) 53-64

Uzawa K., Yeowell H.N., Yamamoto K., Mochida Y., Tanzawa H., Yamauchia M. "Lysine Hydroxylation of Collagen in a Fibroblast Cell Culture System" *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305** (2003) 484–487

van der Beek D. et Lekkerkerker H.N.W. "Nematic Ordering vs. Gelation in Suspensions of Charged Platelets" *Europhys. Lett.* **62**:5 (2003) 702-707

van der Rest M. & Bruckner P. "Collagens: Diversity at the Molecular and Supramolecular and Supramolecular Levels" *Current Opinion in Structural Biology* **3**:3 (1993) 430-436

van der Rest M. & Garonne R. "Collagen Family of Proteins" *FASEB J.* **5** (1992) 2814-2823

van der Rest M., Dublet B., Labourdette L., Ricard-Blum S. "Mechanisms of Collagen Trimer Assembly" *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **111**:1 (1999) 105-113

Venturoni M., Gutsmann T., Fantner G.E., Kindt J.H., Hansma P.K. "Investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy" *Biochemical and Biophysical Research Communication* **303** (2003) 508-513

Viamontes, J. Oakes P.W., Tang J.X. "Isotropic to Nematic Liquid Crystalline Phase Transition of F-Actin Varies from Continuous to First Order" *Phys. Rev. Lett.* **97** (2006) 118103

Vroege G.J. & Lekkerkkerker H.N.W. "Phase Transition in Lyotropic Colloidal and Polymer Liquid Crystals" *Rep. Prog. Phys.* **55** (1992) 1241-1309

Wagermaier W., Gupta H.S., Gourrier A., Burghammer M., Roschger P., Fratzl P. "Spiral Twisting of Fiber Orientation Inside Bone Lamellae" *Biointerphases* **1**:1 (2006) 1-5.

Wang J. & Labes M.M. "Control of the Anisotropic Mechanical Properties of Liquid Crystal Polymer Films by Variations in Their Banded Texture" *Macromolecules* **25** (1992) 5790-5793

Wang L. & Bloomfield V.A. "Small-Angle X-ray Scattering of Semidilute Rodlike DNA Solutions: Polyelectrolyte Behavior" *Macromolecules* **24** (1991) 5791-5795

Weber I.T., Harrison R.W., Iozzo R.V. "Model Structure of Decorin and Implications for Collagen Fibrillogenesis" *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 31767–31770

Weiner S. & Traub W. "Bone Structure: From Ångstroms to Microns" *FASEB journal* **6**, (1992) 879-885.

Weiner S., Traub W., Wagner H.D. "Lamellar Bone: Structure Function Relations" *J. Struct. Biol.* **126** (1999) 241-255.

Wenk H.-R. et Heidelbach F. "Crystal Alignment of Carbonated Apatite in Bone and Calcified Tendon: Results From Quantitative Texture Analysis" *Bone* **24** (1999) 361-369.

Wenstrup R.J., Lever L.W., Phillips C.L., Quarles L.D. "Mutations in the COL1A2 Gene of Type I Collagen That Result in Nonlethal Forms of Osteogenesis Imperfecta" *Am. J. Med. Genet.* **45**:2 (2005) 228-232

Wilkinson S.J. et Hukins D.W.L. "Determination of Collagen Fibril Structur and Orientation in Connective Tissues by X-ray Diffraction" *Radiation Physics and Chemistry* **56** (1999) 197-204

Wolman M. et Kasten F.H. "Polarized Light Microscopy in the Study of the Molecular Structure of Collagen and Reticulin" *Histochemistry* **85** (1986) 41-49

Wood G.C. et Keech M.K. "The Formation of Fibrils from Collagen Solutions 1. The Effect of Experimental Conditions: Kinetic and Electron-Microscope Studies" *Biochem J.* **75** (1960) 588-596

Woodhead-Galloway "Structure of the Collagen Fibril: an Interpretation" in: Collagen in Health and Disease, chapitre 3 (1982) 28-48

Woodhead-Galloway J. "The Structure of the Collagen Fibril: An Interpretation (1982) *in*: Collagen in Health and Disease (1982) 28-48

Wu C., Sassa K., Iwai K., Asai S. "Unidirectionnally Oriented Hydroxyapatite/Collagen Composite Fabricated by Using a High Magnetic Field" *Materials Letters* **61** (2007) 1567-1571

Yoshimura K., Terashima M., Hozan D., Shirai K. "Preparation and Dynamic Viscoelasticity Characterization of Alkali-Solubilized Collagen from Shark Skin" *J. Agric. Food Chem.* **48**:3 (2000) 685-690

Young E.G., Lorimer J.W., "A Comparison of the Acid-Soluble Collagens From the Skin and Swim Bladder of the Cod" *Arch. Biochem. Biophys.* **92** (1961) 183-190

Zhai Y. et Cui F.Z. "Recombinant Human-like Collagen Directed Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals" *J. Cryst. Growth* **291** (2006) 202-206.

Zhang J., Luan L., Zhu W. Liu S., Sun D. "Phase Behavior of Aqueous Suspensions of Mg_2Al Layered Double Hydroxide: The Competition among Nematic Ordering, Sedimentation, and Gelation" *Langmuir* **23** 10 (2007) 5331-5337

Zhang L.-J., Feng X.-S., Liu. H.-G., Qian D.-J., Zhang L., Yu X.-L., Cui F.-Z. "Hydroxyapatite/Collagen Composite Materials Formation in Simulated Body Fluid Environment" *Materials Letters* **58** (2004) 719-722.

Zhu W., Iatridis J.C., Hlibczuk V., Ratcliffe A., Mow V.C. "Determination of Collagen-Proteoglycan Interaction In Vitro" *J. Biomechanics* **29**:6 (1996) 773-783

Cooperative Ordering of Collagen Triple Helices in the Dense State

F. Gobeaux,[†,‡] E. Belamie,*[,†] G. Mosser,[†] P. Davidson,[‡] P. Panine,[§] and M.-M. Giraud-Guille[†]

Chimie de la Matière Condensée, UMR 7574 CNRS−Université Pierre et Marie Curie, ENSCP−Ecole Pratique des Hautes Etudes, 12 rue Cuvier, 75005 Paris, Laboratoire de Physique des Solides, UMR 8502, CNRS, Université Paris Sud, Bât. 510, 91405 Orsay Cedex, and High Brilliance Beamline ID2, European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, F-38043 Grenoble Cedex, France

Received January 12, 2007. In Final Form: March 8, 2007

Extracellular matrixes such as bone, skin, cornea, and tendon have ordered structures comprised for the most part of collagen, an elongated protein of well-defined dimensions and composition. Here we show how the cooperative ordering of collagen triple helices in the dense fluid state is exploited to produce dense ordered collagen matrixes. The spontaneous formation of a birefringent phase occurs at critical concentrations that increase from 50−60 to 80−85 mg/mL as the acetic acid concentration of the solvent increases from 5 to 500 mM. We studied by small-angle X-ray scattering (SAXS) the local liquidlike positional order across the isotropic/anisotropic phase transition by unwinding the cholesteric phase with moderate shearing stress. Interparticle scattering gives rise to a broad interference peak. The average distance between triple helices, d_{av}, is thus estimated and decreases linearly as a function of $\phi^{-1/2}$ from 12.7 ± 0.9 nm (22.5 mg/mL) to 5.0 ± 0.6 nm (166.4 mg/mL). Equilibrium concentrations and the order parameter of the nematic phase agree reasonably well with theoretical predictions for semiflexible macromolecules. Striated fibrils with a high degree of alignment were obtained by fine-tuning the delicately balanced electrostatic interactions, which yielded strong elastic gels with a hierarchical organization very similar to that of major biological tissues. Typical Bragg reflections corresponding to the 67 nm period characteristic of collagen fibrils in biological tissues were recorded by SAXS with ordered collagen matrixes reconstituted in vitro.

Introduction

Connective tissues are complex biological systems with integrated properties and functions and represent a good source of inspiration for material scientists.[1] The biosynthesis of type I collagen involves a controlled spatiotemporal sequence of protein expression, folding, transport, and secretion into the extracellular space. A unique feature of collagen is the highly periodic nature of its assembly from the amino acid sequence to its long-range organization in soft and hard tissues. Collagen molecules are formed by three polypeptide chains folded together into a triple helical structure approximately 300 nm in length and 1.5 nm in diameter.[2] After procollagen has been secreted by cells, the nonhelical propeptides present at both ends of the molecule are removed by specific enzymes. The resulting mature collagen is insoluble at physiological pH and precipitates into fibrils, known to consist of periodic three-dimensional assemblies of triple helices with a long-range axial periodicity. The molecules are assembled axially head-to-tail and set laterally 1.2 nm apart on a quasi-hexagonal lattice[3,4] with a 67 nm stagger of the centers of mass.[5] This regularly staggered structure induces periodic variations of electron density visible in electron microscopy as cross-striations and by X-ray diffraction as sharp Bragg peaks. Finally, at the micrometer to millimeter scale most of the tissues mentioned above exhibit a very regular, often periodic, suprafibrillar organization. An example is the lamellar morphology of compact bone, where the collagen−apatite composite exhibits a long-range helical geometry,[6] which helps to limit the propagation of cracks.[7]

The structural analogy between major extracellular matrixes and mesophases[8,9] suggests that a transient liquid-crystal state could direct the formation of highly ordered biological tissues. This hypothesis has been formulated for a number of biological materials, and lyotropic liquid-crystalline states have been described in vivo.[10−16] Cooperative ordering in suspensions of elongated macromolecules or particles can be addressed theoretically by considering that the predominant interaction is the excluded volume between impenetrable particles.[17]

We show here, through in vitro experiments, that self-assembly processes may account for major aspects of collagen organization in connective tissues.[18] On the basis of theoretical models of a lyotropic mesophase of charged semiflexible spherocylinders with a large aspect ratio (L/D),[19,20−21] we show that the intrinsic properties of collagen triple helices can yield the complex ordered structures observed in biological tissues. In particular, the helical

* Corresponding author. E-mail: ebelamie@snv.jussieu.fr. Tel.: +33 (0) 4 67 16 34 44. Fax: +33 (0) 4 67 16 34 70.

† CNRS-EPHE-UPMC.

‡ CNRS-Université Paris Sud.

§ European Synchrotron Radiation Facility.

(1) Sanchez, C.; Arribart, H.; Giraud-Guille, M.-M. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 277−288.

(2) Woodhead-Galloway, J. *Studies in Biology*; E. Arnold: London, 1980; Vol. 117.

(3) Hulmes, D. J. S.; Miller, A. *Nature* **1979**, *282*, 878−880.

(4) Hulmes, D. J. S. *J. Struct. Biol.* **2002**, *137*, 2−10.

(5) Kadler, K. E.; Holmes, D. F.; Trotter, J. A.; Chapman, J. A. *Biochem. J.* **1996**, *316*, 1−11.

(6) (a) Giraud-Guille, M.-M. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1998**, *3*, 221−227. (b) Giraud-Guille, M.-M. *Calcif. Tissue Int.* **1988**, *42*, 167−180.

(7) Peterlik, H.; Roschger, P.; Klaushoffer, K.; Fratzl, P. *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 52−55.

(8) Bouligand, Y. *Tissue Cell* **1972**, *4*, 189−217.

(9) Neville, A. C. *Biology of fibrous composites, development beyond the cell membrane*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1993.

(10) Neville, A. C. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1981**, *76*, 279−286.

(11) Neville, A. C.; Luke, B. M. *J. Cell Sci.* **1971**, *8*, 93−109.

(12) Knight, D. P.; Feng, D.; Stewart, M.; King, E. *Philos. Trans. R. Soc. London, B* **1993**, *341*, 419−436.

(13) Kerkam, K.; Viney, C.; Kaplan, D.; Lombardi, S. *Nature* **1991**, *349*, 596−598.

(14) Vollrath, F.; Knight, D. P. *Nature* **2001**, *410*, 541−548.

(15) Livolant, F.; Bouligand, Y. *Chromosoma* **1978**, 68 21−44

(16) Willison, J. H. M.; Abeysekera, R. M. *J. Polym. Sci.* **1988**, 26, 71−75.

(17) Onsager, L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, *51*, 627−659.

(18) Belamie, E.; Gobeaux, F.; Mosser, G.; Giraud-Guille, M.-M. *J. Phys.: Condens. Matter.* **2006**, *18*, 115−129.

(19) Khokhlov, A. R.; Semenov, A. N. *Physica A* **1982**, *112*, 605−614.

(20) Odijk, Th. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2313−2329.

(21) Chen, Z. Y. *Macromolecules* **1993**, *26*, 3419−3423.

10.1021/la070093z CCC: $37.00 © 2007 American Chemical Society
Published on Web 04/19/2007

organization of collagen in bone[6] is reminiscent of the chiral structure of cholesteric liquid crystals. The microscopic textures and the localization of the phase transition confirm[22−24] that highly concentrated collagen solutions exhibit properties similar to those of polymer liquid crystals. The microscopic structure of the nematic phase is described by probing the local order with small-angle X-ray scattering (SAXS). Finally, we show how a sol−gel transition can easily be triggered to stabilize the liquid-crystal phase into a dense ordered fibrillar material that mimics the hierarchical organization of biological tissues with interesting properties.

Experimental Section

Collagen Preparation. Type I collagen was extracted from Wistar rat tails. The tendons were excised in a sterile cell culture hood and washed with PBS (phosphate-buffered saline) to remove cells and traces of blood. The tissues were then soaked in a 4 M NaCl solution to lyse the remaining cells and precipitate some of the high-molecular-weight proteins. After being rinsed again with PBS, the clean tendons were solubilized in 500 mM acetic acid. The solution was clarified by a first centrifugation step at 41000*g* for 2 h. Proteins other than type I collagen were selectively precipitated in 300 mM NaCl and removed by centrifugation at 41000*g* for 3 h. Collagen was retrieved from the supernatant by precipitation in 600 mM NaCl and centrifugation at 3000*g* for 45 min. The pellets were solubilized in the final solvent (acetic acid, 5, 50, or 500 mM) and thoroughly dialyzed against the same solvent to completely remove NaCl. The solutions were kept at 4 °C and centrifuged at 41000*g* for 4 h before use. The collagen concentration was determined by assessing the hydroxyproline amount[25] and purity assessed by SDS−PAGE electrophoresis. Given the quantities necessary for our experiments, we could not afford too drastic a purification, and traces of collagen, types III and V, and proteoglycans can still be present.

Sample Preparation and Texture Analysis. The solvent, 5, 50, or 500 mM acetic acid, was slowly evaporated from a large volume of dilute collagen solution (5 mg/mL) in sterile conditions. In the concentration range near the transition, samples were taken at regular intervals, tested for their birefringence, and titrated. The optical birefringence and textures of the collagen solutions were investigated to determine the critical concentrations and the large-scale molecular organization of the samples. For this purpose, samples of the collagen solutions were sucked into 200 μm thick flat capillary tubes and observed between crossed polarizers on a Nikon Eclipse E600Pol microscope, equipped with a DXM 1200 CCD camera to capture high-resolution pictures. Dilute collagen solutions are isotropic and appear dark when viewed between crossed polarizers. In contrast, concentrated collagen solutions exhibit birefringent textures in polarized light microscopy.

We chose solvent evaporation to prepare concentrated samples for mainly two reasons: (i) We wanted the results to be comparable with previous studies.[23,24] (ii) The method, although time-consuming, is much faster than dialysis to prepare a large number of samples in a concentration series. The major drawback of evaporation is that the solvent composition changes because water evaporates faster than acetic acid. To take this effect into account, dilute acetic acid solutions of concentrations 5, 50, and 500 mM were evaporated in the same conditions as the collagen samples and titrated. The acetic acid concentrations determined in this way were used to build up the phase diagram in Figure 2. It must be noted that the overall trend of the graph is not modified by this correction.

Experiments to identify textures were also performed with thin glass chambers continuously fed with a dilute collagen solution at one end. Slow evaporation of the solvent at the other end induces the controlled increase in volume fraction. The solutions first develop a strongly birefringent layer at the air/liquid interface. As evaporation proceeds, the anisotropic domain widens and a new interface is created between an anisotropic, optically birefringent, fluid and an isotropic liquid phase. A detailed description of the setup is given in ref 24. The interface progression speed is on the order of 10 μm/h, and since cholesteric globules are found as far as 50 μm from the isotropic/anisotropic interface, we estimate that the characteristic lifetime of the transitory equilibrium is several hours.

Fibrillogenesis. Concentrated liquid-crystalline samples, in either capillaries or glass chambers, were placed in the presence of ammonia vapors at room temperature.[26,27] Gaseous ammonia slowly dissolves in water and neutralizes the acetic acid, causing the pH to rise locally, without diluting the samples. White, dense opaque gels were obtained after 2−24 h depending on the samples' geometries. After the gels were rinsed in deionized water or PBS until neutral pH was reached, the resulting hydrated elastic solids were directly submitted to X-ray synchrotron radiation or prepared for TEM observations.

SAXS Characterization. SAXS experiments were performed on the ID02 station at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). We investigated the scattering from collagen solutions in a wide q range, from 0.1 to 10 nm^{-1}, using monochromatic synchrotron radiation ($\lambda = 0.0995$ nm) and a sample-to-detector distance of either 1 or 3 m. Two-dimensional SAXS patterns were recorded using an X-ray image intensifier (Thomson) lens coupled to a fast read-out CCD (FreLoN camera) with a typical exposure time of 1 s. Appropriate corrections were carried out,[28] and the data were analyzed with Fit2d (ESRF) and Image (Laboratoire de Physique des Solides (LPS), Université Paris Sud) softwares. Concentrated strongly birefringent samples were placed in the gap of a polycarbonate cylindrical shear cell[29] and subjected to moderate controlled shear stress to produce nematic monodomains. This classic alignment procedure has been applied to many other systems and is comparable to the application of an external electric or magnetic field.[30] The samples used were obtained by slow evaporation of an initial dilute solution in 500 mM acetic acid. The azimuthal profiles were taken at the q value corresponding to the intensity maximum (q_{max}) for a given sample, and the intensity was averaged over 15 CCD pixels. After fibrillogenesis with ammonia vapors, the typical 67 nm periodicity of fibrillar type I collagen was detected with the dense gels inserted in X-ray cylindrical glass capillary tubes and placed directly in the synchrotron beam.

TEM Observations. Dense collagen matrixes and tendons extracted from rat tail were fixed at 4 °C successively in 2.5% glutaraldehyde and in 2% osmium tetraoxide, both for 60 min in a cacodylate buffer at pH 7.4. The samples were then progressively dehydrated through successive ethanol baths (50%, 70%, 95%, 100%) before being embedded in Araldite for ultrathin sectioning. The 60 nm thick sections were deposited on copper grids, stained with phosphotungstic acid, and observed with a Philips CM12 electron microscope operated at 120 kV.

Results

Textures and Sequence of Phases. Highly concentrated collagen solutions were examined in polarized light to assess the first-order nature of the isotropic/cholesteric (I/N*) transition. In concentration gradients, birefringent droplets exhibiting a striped pattern typical of a cholesteric phase were observed to coexist with an isotropic phase (Figure 1a**)**. At even higher volume fractions, the birefringent droplets merge to yield a homogeneous fingerprint pattern (Figure 1b). The succession of bright and dark stripes arises from the helical organization of collagen

(22) Murthy, N. S. *Biopolymers* **1984**, *23*, 1261−1267.
(23) Giraud-Guille, M.-M. *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 861−873.
(24) Mosser, G.; Anglo, A.; Helary, C.; Bouligand, Y.; Giraud-Guille, M. M. *Matrix Biol.* **2006**, *25*, 3−13.
(25) Bergaman, I; Loxley, R. *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 1961−1963.
(26) Besseau, L. A; Giraud-Guille, M.-M. *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 197−202.
(27) Giraud-Guille, M.-M.; Besseau, L. *Connect. Tissue Res.* **1997**, *37*, 183−193.
(28) Narayanan, T.; Diat, O.; Bosecke, P. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A* **2001**, *467*, 1005−1009.
(29) Panine, P.; Gradezielski, M.; Narayanan, T. *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 2451−2455.
(30) Lemaire, B. J.; Davidson, P.; Ferré, J.; Jamet, J. P.; Panine, P.; Dozov, Y.; Jolivet, J. P. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 125507.

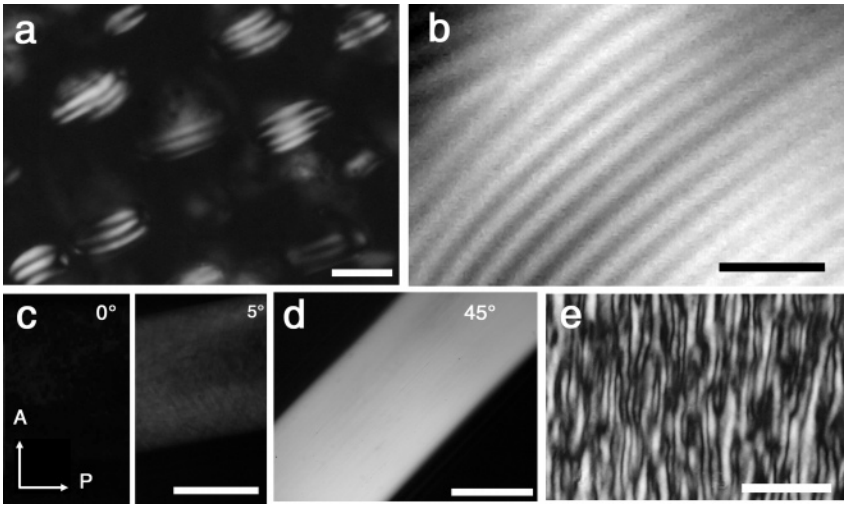


Figure 1. Typical liquid-crystalline textures observed in polarized light microscopy. (a) Birefringent globules with the striped pattern characteristic of the cholesteric phase emerge from the isotropic medium. The coexistence of the two phases indicates a first-order transition. Bar 20 μm. (b) At higher concentrations, the homogeneous anisotropic phase exhibits the typical fingerprint pattern. Bar 10 μm. (c, d) The anisotropic phase is sucked into a capillary tube. The sample appears dark when the nematic director is oriented along the direction of either polarizer (0°) and bright otherwise with a maximum at 45°. Bar 100 μm. (e) Banded textures were observed with highly concentrated collagen solutions sucked into flat capillary tubes. Bar 100 μm. The polarizer and analyzer orientations are indicated in (c).

molecules in the chiral nematic phase, also called cholesteric or N*. The resulting fingerprint pattern with characteristic defects is typical of the textures obtained with other cholesteric liquid crystals, both lyotropic and thermotropic. The cholesteric pitch is typically a few micrometers.

Birefringent samples can be strongly aligned by sucking them into capillary tubes (Figures 1c,d). The moderate shear stress (on the order of 10 s^{-1}) generated by the flow is large enough to unwind the chiral texture and produce homogeneous uniaxial single domains. This also happens when shearing stress is applied in a cylindrical shear cell (see the SAXS experiments below). Highly concentrated viscous samples sucked into capillary tubes display banded textures, with wide bright domains separated by thin extinction lines (Figure 1e**)**. Inserting a retardation plate in the optical path produces colors that indicate undulations of the nematic director in the plane of observation.

Samples were prepared in acetic acid with increasing collagen concentrations to locate the phase transition boundaries. Isotropic samples close to the I/N* transition, when sucked into capillary tubes, exhibit a strong flow birefringence that disappears in a matter of seconds as the sample relaxes and the transient alignment is lost. At higher concentrations, the solutions remain birefringent after shearing. We did not observe the bulk phase separation of the isotropic and cholesteric phases in sheared samples. We can thus locate the dilute boundary of the coexistence domain, i.e., the concentration, C_i, at which samples start to exhibit birefringence at rest. The critical concentrations increase from 50−60 to 80−85 mg/mL as the acetic acid concentration increases from 5 to 500 mM (Figure 2).

Small-Angle X-ray Scattering. Strongly anisotropic SAXS patterns were obtained with highly concentrated collagen solutions submitted to very moderate shear (Figure 3a). The diffuse scattering intensity is higher in the vertical direction, indicating that the elongated collagen molecules are oriented horizontally along the flow direction. The shear-induced alignment does not relax when shearing is stopped, and the strong uniaxial orientation of the sample remains, in good agreement with optical observation of birefringence. In the anisotropic phase, collagen molecules are aligned along an average direction, **n** (nematic director), with an orientational distribution function (ODF), $f(\mathbf{a})$, **a** being

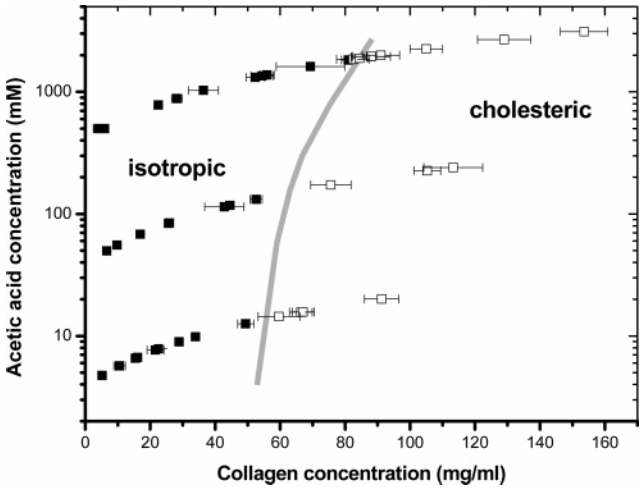


Figure 2. Sequence of phases. Collagen concentration series solutions were prepared in acetic acid at different concentrations. Isotropic samples (■) appear dark or exhibit a transient birefringence. Beyond the critical concentration, the cholesteric samples appear strongly birefringent (□). The thick line is a guide to the eye and indicates the region of the I/N* transition.

the unit vector associated with each individual molecule.[31] The first nonzero moment of the ODF, which quantifies the strength of the ordering, is called the nematic order parameter, *S*. Taking a section through the 2D pattern at a fixed **q** modulus gives a profile of the intensity as a function of the azimuthal angle ψ (Figure 3b), the shape of which is directly related to the molecules' orientational distribution. To estimate *S*, the profiles were fitted according to a procedure described elsewhere.[32] A flat profile corresponds to a disordered sample ($S = 0$), whereas a sharp peak indicates strong alignment of the molecules ($S \rightarrow 1$). Typically, for a 90 mg/mL collagen solution in 500 mM acetic acid, optically birefringent at rest but close to the phase boundary, the order parameter *S* is estimated to be 0.45 ± 0.1. Interparticle scattering gives rise to a broad interference peak due to liquidlike order, whose maximum is located at a *q* value, q_{max}, inversely

(31) Maier, W.; Saupe, A. *Z. Naturforsch.* **1958**, *13*, 564−566.
(32) Davidson, P.; Petermann, D.; Levelut, A. M. *J. Phys. II* **1995**, *5*, 113−131.

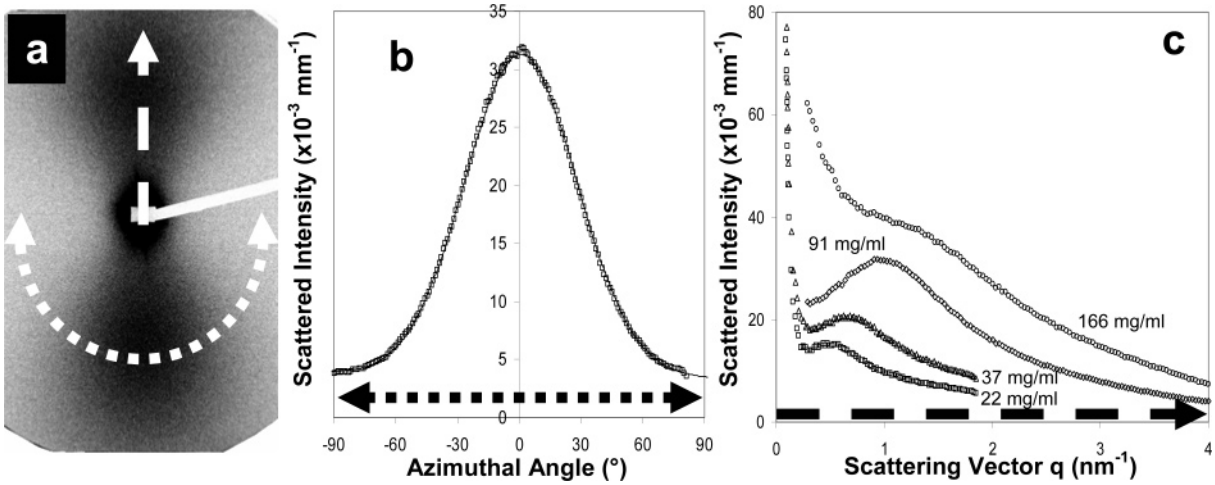


Figure 3. Small-angle X-ray scattering of concentrated collagen solutions spanning the I/N* transition: (a) SAXS pattern of a nematic collagen solution (91 mg/mL) recorded under moderate shear ($\dot{\gamma} = 8\ s^{-1}$), (b) experimental azimuthal profile taken along the curved dotted line at q_{max} as indicated in (a) (symbols) and fitted according to ref 32 (line), **(c)** linear profiles $I = f(q)$ taken along the vertical direction of the SAXS pattern at concentrations spanning the whole range investigated.

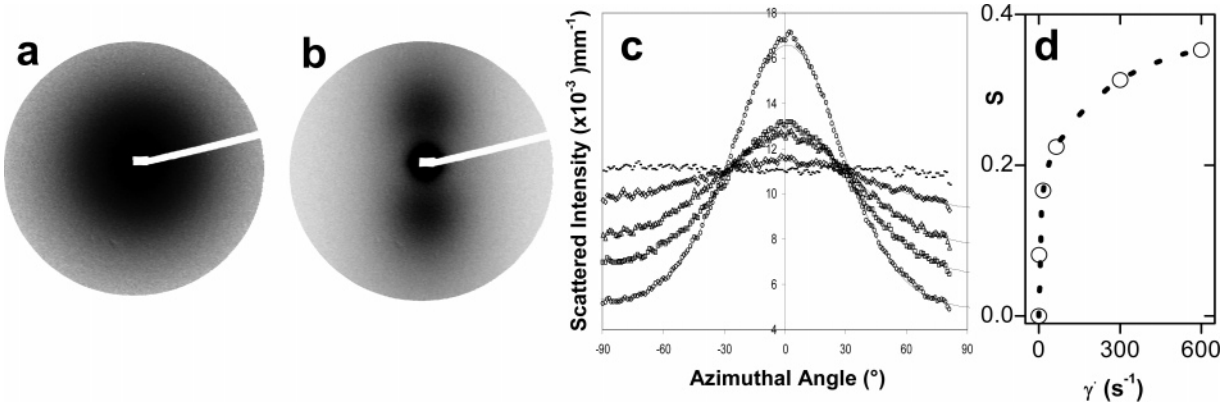


Figure 4. Small-angle X-ray scattering of an isotropic collagen solution (37 mg/mL). (a) Relaxed state. The SAXS pattern ($\dot{\gamma} = 0\ s^{-1}$) is isotropic. (b) The same solution under shearing ($\dot{\gamma} = 400\ s^{-1}$) yields a strongly anisotropic pattern indicating shear-induced order. (c) Azimuthal profiles of a 37 mg/mL solution under increasing shear stress (0, 1, 16, 64, and 300 s^{-1}). The profile is flat at $\dot{\gamma} = 0$ and becomes sharper as the shear stress is increased. **(**d**)** Values of S estimated by fitting the intensity azimuthal profiles[32] as a function of $\dot{\gamma}$.

proportional to the average distance, d_{av}, between the triple helices ($q_{max} = 2\pi/d_{av}$). Radial profiles of the intensity scattered at small angles, $I = f(q)$, display maxima (Figure 3c) and were used in combination with the 2D patterns to determine the d_{av} values plotted in Figure 5.

SAXS patterns of dilute samples are isotropic at rest but turn anisotropic under shear (Figure 4a,b). In agreement with optical observations of flow birefringence, the samples appear to relax very fast, as the scattering patterns quickly revert to isotropic once the shearing stress is stopped. Shear-induced ordering of the isotropic phase is revealed by the azimuthal profiles becoming sharper as the shear stress is increased (Figure 4c). The order parameter measured under shear rapidly increases from 0 to 0.1 for a very moderate shear stress of 1 s^{-1}. Isotropic samples also exhibit an interference peak, revealing local positional order. The values of d_{av} determined with nematic and isotropic samples are shown together in Figure 5. The average distance, d_{av}, decreases with increasing volume fraction, ϕ, following a straight line that goes through the origin, as a function of $\phi^{-1/2}$.

The relatively large width of the peaks in Figure 3c indicates that the local positional order only extends to nearest neighbors. The correlation length, ξ, of the liquidlike order, calculated as $\xi = 2\pi/\Delta q$ (with Δq the peak's fwhm), does not exceed 25 nm

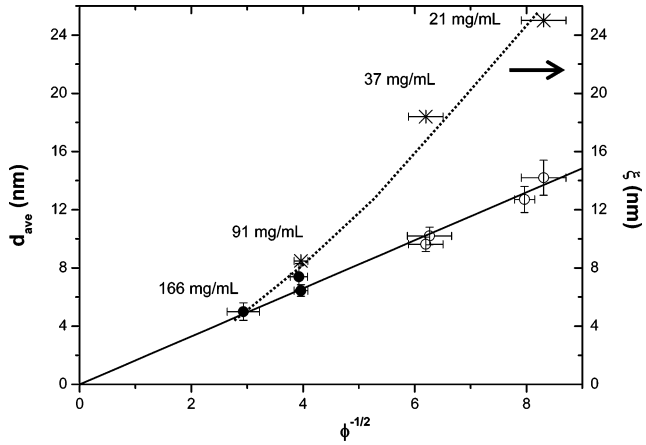


Figure 5. Dilution law of collagen in acetic acid. Left axis: average distance between collagen molecules ($d_{av} = 2\pi/q_{max}$) as a function of $\phi^{-1/2}$ (cholesteric, ●; isotropic, ○). Right axis: corresponding correlation length of the local order, ξ (*). The labels indicate concentrations in milligrams per milliliter.

(at 22.5 mg/mL) and tends to decrease as the triple helices become more tightly packed, down to 8.5 nm at 91 mg/mL ($d_{av} = 6.45$ nm).

Biomimetic Fibrillar Matrixes. We subjected highly concentrated collagen solutions to ammonia vapor to induce

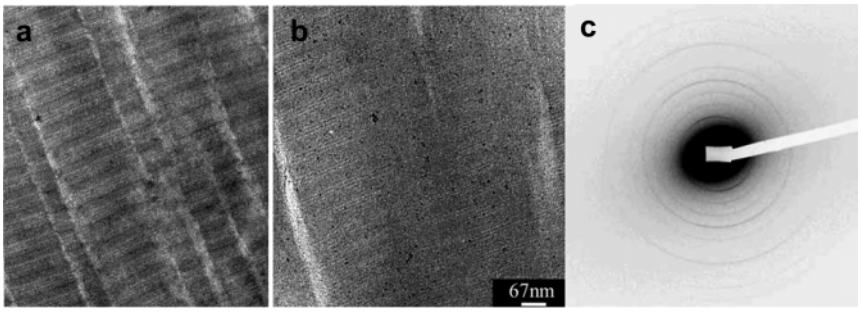


Figure 6. Typical 67 nm period of collagen fibrils in dense matrixes: TEM observations of rat tail tendon (a) and an 18 wt % dense aligned collagen matrix (b). The SAXS pattern in (c) corresponds to a dense gel reconstituted in vitro as in (b).

precipitation into fibrils to form a strong gel.[26,27] Gaseous NH_3 that dissolves in the aqueous phase raises the pH by neutralizing the acetic acid, while keeping the collagen volume fraction unchanged. For comparison, ultrathin sections of rat tendon observed by TEM displayed in Figure 6a show bundles of cross-striated fibrils. The same pattern is actually observed with sections of a dense gel (18 wt %) prepared by reassembly in vitro (Figure 6b). The SAXS patterns recorded with the dense gels formed in capillary tubes are slightly anisotropic at the smallest angles, indicating the presence of large aligned aggregates. The wide-angle interference peak, corresponding to lateral interactions between triple helices in the fibrils, gives an intermolecular distance of about 1.5 nm (preliminary data, not shown). Sharp Bragg rings corresponding to harmonics of the 67 nm periodicity of the fibrils also show a small but significant reinforcement in the vertical direction. The azimuthal spread measured on a radial intensity profile is typically less than 40°.

Discussion

Study of the Textures in Polarized Light. The fingerprint patterns observed with slowly evaporated collagen solutions are typical of a cholesteric phase and were presented in previous papers.[23,24] The coexistence of cholesteric globules with an isotropic phase shown in Figure 1a is a clear indication that the transition is of the first-order type. Transitory thermodynamic equilibrium is thus reached despite the concentration gradient induced by evaporation. Controlled evaporation in thin glass chambers has proven a very suitable method to produce and observe biphasic samples in a reproducible manner. This experimental setup is based on the continuous injection of collagen in a confined space. Although concentration is obtained by slow evaporation of the solvent at one interface, the system is continuously enriched with a fresh dilute solution. Therefore, it is likely that diffusion of acetic acid allows equilibration throughout the chamber.

The banded pattern presented in Figure 1e looks like those reported during evaporation of collagen solutions either between the slide and coverslip or with an open air interface[27,33,34] and with DNA fragments.[35] Banded textures are ubiquitous in polymer liquid crystals subjected to shear[36,37] and have been shown to arise from periodic undulations of the director around the shear direction[38] due to stress relaxation. There is strong evidence in the literature supporting the idea of a liquid-crystalline state preceding the formation of many biological materials. In some instances, the mesophase was identified in vivo, and the presence of distortions induced by shear during biological processing was demonstrated in particular for the collagenous material of the dogfish egg case[12,39] and the spider's silk protein.[13,14] Interestingly, in tendon, the collagen fibrils follow an undulating organization called crimp[40−43] that exhibits some similarities with the instabilities observed with polymer liquid crystals under external fields.[36,44] Whether or not the crimp in tendon might originate from similar mechanisms as those inducing in vitro the formation of banded texture is not yet demonstrated. However, shear-induced banding of collagen solutions could be exploited to prepare materials with specific properties inspired from the crimp structure of tendon.

Isotropic/Cholesteric Phase Transition. According to the phase diagram presented in Figure 2, the transition from a disordered isotropic phase to a chiral nematic one occurs at critical concentrations that increase from 50−60 to 80−85 mg/mL as the initial acetic acid concentration of the solvent increases from 5 to 500 mM. The original theory of the isotropic/nematic (I/N) transition was developed by Onsager for rigid rods.[17] Khokhlov and Semenov[19] proposed an extension that accounts for the particles' flexibility, characterized by the ratio $\alpha = L/P$, where L is the contour length and P the persistence length. The authors showed that flexibility would increase the critical concentrations and lower the order parameter. On the basis of the marked flexibility of collagen triple helices, Chen's simulations[21] for long semiflexible molecules were used to estimate the concentration, C_i, expected at the transition. The repulsive potential between the like-charged macromolecules extends over a few Debye lengths and was treated as a scaling factor by considering an effective electrostatic diameter, D_{eff}, instead of the bare geometrical one, D_{bare}.[19−21,45−48] The net charge of collagen was estimated on the basis of its amino acid sequence (Swiss-Prot protein database). Taking into account a hydroxylation level of lysines of about 20%,[49] we found an excess of typically 232 positive charges in 5 mM acetic acid (pH 3.52), or 257 in 500 mM acetic acid (pH 2.53). In these conditions and for a total collagen concentration of 100 mg/mL, for instance, the corresponding values of D_{eff} are respectively 3.96 and 3.73 nm, more

(33) Maeda, H. *Langmuir* **1999**, *15*, 8505−8513.
(34) Maeda, H. *Langmuir* **2000**, *16*, 9977−9982.
(35) Livolant, F. *J. Phys. (Paris)* **1987**, *48*, 1051−1066.
(36) Yan, N. X.; Labes M. M. *Macromolecules* **1994**, *27*, 7843−7845.
(37) Wang, J.; Labes, M. M. *Macromolecules* **1992**, *25*, 5790−5793.
(38) Han, W. H.; Rey, A. D. *Macromolecules* **1995**, *28*, 8401−8405.
(39) Knight, D. P.; Hu, X. W.; Gathercole, L. J.; Rusaouën-Innocent, M.; Ho, M.-W.; Newton, R. *Philos. Trans. R. Soc. London, B* **1996**, *351*, 1205−1222.
(40) Diamant, J.; Keller, A.; Baer, E.; Litt, M.; Arridge, R. G. C. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **1972**, *180*, 293−315.
(41) Gathercole, L. J.; Keller, A. *Micron* **1978**, *9*, 83−89.
(42) Vidal, B. *Micron* **2003**, *34*, 423−432.
(43) Feitosa, V. L. C.; Reis, F. P.; Esquisatto, M. A. M; Joazeiro, P. P.; Vidal, B. C.; Pimentel, E. R. *Micron* **2006**, *37*, 518−525.
(44) Curtis, R. F. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2431−2435.
(45) Stroobants, A.; Lekkerkerker, H. N. W.; Odijk, Th. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2232−2238.
(46) Lee, S. D. *J. Chem. Phys.* **1987**, *87*, 4972−4974.
(47) Tang, J.; Fraden, S. *Liq. Cryst.* **1995**, *19*, 459−467.
(48) Sato, T.; Teramoto, A. *Physica A* **1991**, *176*, 72−86.
(49) Uzawa, K.; Yeowell, H. N.; Yamamotoa, K.; Mochidaa, Y.; Tanzawab, H.; Yamauchi, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 484−487.

than $2D_{bare}$. Using published values of 160 nm,[50−52] 112 nm,[51] and 57 nm[53] for the persistence length, we obtained critical concentrations, C_i, of, respectively, 15.4, 28.9, and 111.8 mg/mL for samples of the 500 mM acetic acid series. This illustrates the high sensitivity of the model to flexibility,[19,21] and the predicted concentrations essentially bracket the experimental data of 80−85 mg/mL. The agreement is nevertheless significantly closer than the value of 2.95 mg/mL predicted by Onsager's model for rigid rods in the same conditions. As seen in Figure 2, the experimental coexistence concentrations tend to increase as the acetic acid concentration is increased. This trend is also well predicted by the theory as C_i increases from about 98.6 mg/mL in 5 mM acetic acid to 111.8 mg/mL in 500 mM acetic acid, with $P = 57$ nm. This is true for every persistence length and is a direct consequence of the decrease in D_{eff} being essentially due to the higher ionic strength at higher acetic acid concentration. More accurate quantitative testing of the models would require the determination of P in our experimental conditions and in particular at very high collagen concentration. In the description of the I/N transition in statistical physics models, two entropic terms contribute to the total free energy and vary inversely as the degree of order increases. The entropy of mixing favors the random orientation of the rods and is highest in the isotropic phase. The excluded volume entropy decreases the total free energy as the average angle between neighboring particles becomes smaller, in favor of tighter packing in the nematic phase. A typical feature of the I/N first-order transition is the discontinuity in the order parameter, S. For perfectly rigid rods, S is predicted to be 0 in the isotropic phase, 0.8 in the nematic phase at coexistence, and 1 for an ideally aligned sample. The value of 0.45 ± 0.1 determined from the SAXS patterns of collagen aligned samples is very close to that expected for semiflexible particles. The predicted value[21] of S varies from 0.477 with the highest value of the persistence length ($P = 160$ nm) to 0.492 if the particles are considered more flexible ($P = 57$ nm). Therefore, theories for elongated semiflexible particles with an effective diameter controlled by surface charges describe and predict reasonably well the isotropic/cholesteric phase transition of collagen solutions at high volume fractions.

Local Order in the Dense Solutions. For a nematic phase of very anisotropic charged rodlike particles, the dependence of d_{av} on the volume fraction, also called the "swelling law", is of the form[54−61] $d = k\phi^{-1/2}$. This is expected for solutions, both anisotropic and isotropic, well above the overlap concentration, $c^* = 1/L^3$. If we further assume that the molecules' axes are set locally on a 2D hexagonal lattice, the slope ($k = 0.825$ D) gives a triple helix diameter of 1.9 nm, in reasonable agreement with the value of 1.5 nm given in the literature. The correlation length, ξ, inferred from the linear profiles is at most 25 nm at a concentration where $d_{av} = 12.7$ nm, which clearly shows that the order extends only to nearest neighbors. Moreover, the interference peak broadens as the concentration is increased and even vanishes at 166 mg/mL, suggesting that the electrostatic repulsions predominant at lower volume fraction may be overcome by attractive interactions at high packing densities. Although counterintuitive, such a vanishing of the correlation peak in suspensions of rodlike molecules stabilized by electrostatic repulsion is actually rather the rule than the exception.[57,62−64]

Alignment of the Isotropic Phase under Shear. Expectedly, the isotropic phase shows no birefringence at rest (Figure 1a), and the corresponding SAXS patterns show no long-range orientational order (Figure 4a). However, when submitted to even moderate shear stress, the solutions exhibit transient birefringence that disappears as soon as the shearing is stopped. The order parameters inferred from the corresponding scattering patterns, taken during the application of shear, show a sharp increase of S at moderate values of shear stress and then a slow increase, theoretically tending toward 1. Such a strong susceptibility to shear probably reveals a tendency to local orientational ordering in the isotropic phase, as previously reported for fd-virus[61] and TMV[55] suspensions at concentrations above c^*. $S = 0.35$ is the highest value that could be reached in the shear stress range accessible experimentally (600 s^{-1}) (Figure 4d). This is therefore the practical limit of alignment for anisotropic materials prepared from isotropic collagen solutions at $c < 80$ mg/mL in 500 mM acetic acid.

Biomimetic Fibrillar Matrixes Exhibit the Typical 67 nm X-ray Diffraction Signal. Negative staining of the samples reveals in TEM the succession of gap and overlap zones (Figure 6a,b) along the collagen fibrils present in the dense gels as in rat tail tendons. The regular striations arise from variations in the electron density along the fibrils, and their periodicity ($D = 67$ nm) is due to the regularly staggered arrangement of adjacent macromolecules.[2,65] Because of the extreme regularity along the fibril axis and because of lateral liquidlike order, an analogy has been made with lamellar liquid crystals.[66,67] We were able to identify Bragg reflections from the 67 nm period (Figure 6c) in dense anisotropic gels reconstituted in vitro. Collagen fibrils in vivo usually have a finite lateral size and are locally packed closely parallel to each other (Figure 6a). TEM observations show a similar local alignment of fibrils in our samples, confirmed by SAXS, with an azimuthal spread of the Bragg reflections of about 40°. It should be noted that, in the absence of shear, the gels exhibit long-range helicity because of the intrinsic chiral nature of the fluid phase.[24,26] This long-range chirality preserved in the solid may confer interesting mechanical properties to reassembled materials.[7]

Unlike the orientational order in the nematic phase dominated by cylindrically averaged repulsions in the nanometer range, the formation of ordered fibrils involves details of the amino acid distribution, on the angstrom scale. Repulsive interactions arising from the excess of positive charges are maximal at acidic pH. Between pH 6 and pH 9 the net charge is only slightly positive and the isoelectric point is reached around pH 9.3. In the neutral-

(50) Claire, K; Pecora, R. *J. Phys. Chem.* **1997**, *101*, 746−753.
(51) Saito, T.; Iso, N.; Mizuno, H.; Onda, N.; Yamato, H.; Odashima, H. *Biopolymers* **1982**, *21*, 715−728.
(52) Henry, F.; Nestler, M.; Hvidt, S.; Ferry, J. D.; Veis, A. *Biopolymers* **1983**, 22, 1747−1758.
(53) Hofmann, H.; Voss, T.; Kühn, K.; Engel, J. *J. Mol. Biol.* **1984**, *172*, 325−343.
(54) Groot, L. C. A.; Kuil, M. E.; Leyte, J. C.; Van der Maarel, J. R. C.; Heenan, R. K.; King, S. M.; Jannick, G. *Liq. Cryst.* **1994**, *17*, 263−276.
(55) Maier, E. E.; Krause, R.; Deggelmann, M.; Hagenbüchle, M.; Weber, R.; Fraden, S. *Macromolecules* **1992**, *25*, 1125−1133.
(56) Purdy, K. R.; Dogic, Z.; Fraden, S.; Rühm, A.; Lurio, L.; Mochrie, S. G. J. *Phys. Rev. E* **2003**, *67*, 31708.
(57) Belamie, E.; Davidson, P.; Giraud-Guille, M. M. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 14991−15000.
(58) De Gennes, P. G.; Pincus, P.; Velasco, R. M.; Brochard, F. *J. Phys. (Paris)* **1976**, *37*, 1461−1473.
(59) Keates, P.; Mitchell, G. R.; Peuvrel, E. *Polymer* **1992**, 33, 3298−3301.
(60) Borsali, R.; Rinaudo, M.; Noirez, L. *Macromolecules* **1995**, *28*, 1085−1088.
(61) Hagenbüchle, M.; Weyerich, B.; Deggelmann, M.; Graf, C.; Krause, R.; Maier, E. E.; Schultz, S. F.; Klein, R.; Weber, R. *Physica A* **1990**, *169*, 29−41.
(62) Wang, L.; Bloomfield, V. A. *Macromolecules* **1991**, *24*, 5791−5795.
(63) Orts, W. J.; Godbout, L.; Marchessault, R. H.; Revol, F.-F. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5717−5725.
(64) Pelletier, O.; Davidson, P.; Bourgaux, C.; Livage, J. *Europhys. Lett.* **1999**, *48*, 53−59.
(65) Bruns, R. R.; Trelstad, R. L.; Gross, J. *Science* **1973**, *181*, 269−271.
(66) Hukins, D. W. L.; Woodhead-Galloway, J. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1977**, *41*, 33−39.
(67) Fratzl, P.; Fratzl-Zelman, N.; Klaushofer, K. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 260−266.

to-basic pH range, not only are striated fibrils formed but the concentrated collagen solutions turn into strong elastic gels. It is likely that the fibrils act as reticulation nodes and ensure the strong coherence of the solid. We have noticed that the dense gels do not readily redissolve in acetic acid, possibly indicating chemical reticulation, as suggested, among others, by Suarez et al., who studied the reversibility of fibrillogenesis by synchrotron radiation X-ray scattering.[68] Reconstituted fibrils are often obtained from dilute solutions[69] or, in contrast, after thorough dehydration.[70,71] In the present work, combined TEM and SAXS studies prove that the delicate molecular interaction between tightly packed triple helices required for the formation of striated fibrils is reached in highly concentrated collagen solutions, despite their highly viscoelastic behavior. X-ray scattering has been used previously to study the structure of in vitro reconstituted fibrils and its dependence on pH, osmotic pressure, temperature, etc. We now have the opportunity to study how typical fibrils' X-ray signals (∼1.5 and 67 nm) appear in dense liquid-crystalline collagen solutions. Abundant literature has been devoted to the formation of striated fibrils in vitro and in vivo (see, for instance, refs 4, 5, 69, and 71−75). However, questions remain as to how fibrils are formed in vivo, how their diameter is regulated, and how their composition is adapted to meet the functional requirements of different tissues, although a number of additional macromolecules, collagenous or not, have already been shown to play specific roles.[73−76] The large-scale organization of collagen, undulated in tendon,[40−43] orthogonal in cornea,[77] and helical in bone,[6] is even more difficult to explain. Besides the control exerted by cells[74,75,78] on collagen secretion, simple physicochemical parameters can largely influence the 3D ordering of the protein in the extracellular space. A better understanding of the influence of factors such as concentration, ionic strength, and pH, or the effect of external fields such as shearing, might help answer questions regarding the in vivo processes of collagen assembly.

Conclusions

The outstanding solution properties of collagen make it a versatile system for tailoring ordered materials with hierarchical levels of organization. We were able to assess the first-order nature of the isotropic/cholesteric phase transition in highly concentrated collagen solutions. Mapping out the phase diagram revealed that the critical concentrations increase by 50%, from 50−60 to 80−85 mg/mL, as the acetic acid concentration of the solvent increases from 5 to 500 mM. In the latter case, the theoretical predictions range from 15.4 to 111.8 mg/mL depending on the value considered for the persistence length of collagen, reasonably bracketing the experimental data. Variations of the average distance between triple helices deduced from SAXS patterns, d_{av}, as a function of the volume fraction indicate local 2D hexagonal packing of the triple helices. The diffuse scattering shows only liquidlike order characterized by a low value of the correlation length. In fact, the highest value taken by ξ is 25 nm when $d_{av} = 12.7$ nm, and therefore, lateral order is limited to nearest neighbors. However, concentrated anisotropic solutions exhibit a relatively high nematic order parameter of 0.45, as expected from modeling. The triple helices thus have the intrinsic ability to strongly align locally while remaining several nanometers apart, in the liquid-crystal state. Orientational ordering of soluble collagen in vitro occurs spontaneously without requiring any protein activity or cellular action. Obviously the situation in vivo is far more complex, where chaperone activity, plasma membrane folding, and the secreting cells' cytoskeletons can play a role in the extracellular trafficking and processing of collagen. In vitro, increasing the pH of concentrated liquid-crystalline solutions results in the formation of strong gels comprised of locally aligned cross-striated fibrils. Typical Bragg reflections, corresponding to the 67 nm period characteristic of collagen fibrils in biological tissues, were recorded by SAXS with ordered collagen matrixes reconstituted in vitro. Because we know that the fluid state follows self-assembly principles described by statistical physics, we can apply theoretical models to fine-tune the local and long-range organization of collagen in solution. It is therefore possible to prepare a wide variety of ordered hierarchical materials, mimicking biological connective tissues, by applying the same processes. However, apart from fibrillar collagens, living tissues are also comprised of other important macromolecules, specific cell types, and in some cases a mineral phase, all participating in their structures, specificities, and functionalities. These aspects are currently under investigation, in particular the behavior of specialized cells such as fibroblasts[79] or osteoblasts in the presence of reconstituted fibrillar matrixes.

Acknowledgment. We thank J. Doucet and D. Durand for very helpful discussions. We also thank Rachel Carol for reading and revising the manuscript.

LA070093Z

(68) Suarez, G.; Oronsky, A. L.; Bordas, J.; Koch, M. H. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 4693−4696.
(69) Wood, G. C.; Keech, M. K. *Biochem. J.* **1960**, *75*, 588−598.
(70) Leikin, S.; Rau, D. C.; Parsegian, V. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 276−280.
(71) Kuznetsova, N.; Leikin, S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36083−36088.
(72) Comper, W. D.; Veis, A. *Biopolymers* **1977**, *16*, 2113−2131.
(73) Gelman, R. A.; Williams, B. R.; Piez, K. A. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 180−186.
(74) Canty, E. G.; Kadler, K. E. *Comp. Biochem. Physiol., Part A* **2002**, *133*, 979−985.
(75) Canty, E. G.; Kadler, K. E. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 1341−1353.
(76) Holmes, D. F.; Watson, R. B.; Chapman, J. A.; Kadler, K. E. *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 93−97.
(77) Trelstad, R. L.; Coulombre, A. J. *J. Cell Biol.* **1971**, *50*, 840−858.
(78) Canty, E. G.; Lu, Y.; Meadows, R. S.; Shaw, M. K.; Holmes, D. F.; Kadler, K. E. *J. Cell Biol.* **2004**, *165*, 553−563.
(79) Helary, C.; Ovtracht, L.; Coulomb, B.; Godeau, G.; Giraud-Guille, M.-M. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4443−4452.

doi:10.1016/j.jmb.2007.12.047 J. Mol. Biol. (2008) 376, 1509–1522

JMB

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

ELSEVIER

Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study

F. Gobeaux[1,2], G. Mosser[1]*, A. Anglo[1], P. Panine[3], P. Davidson[2], M.-M. Giraud-Guille[1] and E. Belamie[1,4]*

[1]*Chimie de la Matière Condensée, UMR 7574 CNRS—Université Pierre et Marie Curie, ENSCP—Ecole Pratique des Hautes Etudes, 12 rue Cuvier, 75005 Paris, France*

[2]*Laboratoire de Physique des Solides, UMR 8502 CNRS Université Paris Sud XI, Bât. 510, Orsay 91405 Cedex, France*

[3]*High Brilliance Beamline ID2, European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 38043 Grenoble Cedex, France*

[4]*Institut Charles Gerhardt Montpellier, UMR 5253 CNRS-UM2-ENSCM-UM1, Équipe MACS, 8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex 5, France*

Received 27 August 2007; received in revised form 6 December 2007; accepted 19 December 2007
Available online 3 January 2008

Edited by M. Moody

Fibrillogenesis, the formation of collagen fibrils, is a key factor in connective tissue morphogenesis. To understand to what extent cells influence this process, we systematically studied the physicochemistry of the self-assembly of type I collagen molecules into fibrils *in vitro*. We report that fibrillogenesis in solutions of type I collagen, in a high concentration range close to that of living tissues (40–300 mg/ml), yields strong gels over wide pH and ionic strength ranges. Structures of gels were described by combining microscopic observations (transmission electron microscopy) with small- and wide-angle X-ray scattering analysis, and the influence of concentration, pH, and ionic strength on the fibril size and organization was evaluated. The typical cross-striated pattern and the corresponding small-angle X-ray scattering 67-nm diffraction peaks were visible in all conditions in the pH 6 to pH 12 range. In reference conditions (pH 7.4, ionic strength = 150 mM, 20 °C), collagen concentration greatly influences the overall macroscopic structure of the resultant fibrillar gels, as well as the morphology and structure of the fibrils themselves. At a given collagen concentration, increasing the ionic strength from 24 to 261 mM produces larger fibrils until the system becomes biphasic. We also show that fibrils can form in acidic medium (pH ~ 2.5) at very high collagen concentrations, beyond 150 mg/ml, which suggests a possible cholesteric-to-smectic phase transition. This set of data demonstrates how simple physicochemical parameters determine the molecular organization of collagen. Such an *in vitro* model allows us to study the intricate process of fibrillogenesis in conditions of molecular packing close to that which occurs in biological tissue morphogenesis.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: collagen; fibrillogenesis; self-assembly; TEM; X-ray scattering

Introduction

In vivo fibrillogenesis is fundamental to the development of collagenous connective tissues. "Collagen" is a generic term referring to a specific family of proteins formed by three polypeptide chains folded into a triple helical structure. Among the 28 types of collagen known in mammals,[1,2] type I collagen accounts for more than 90% of the total collagen found in nature. It is a major structural protein found in most vertebrate connective tissues[3] and in some invertebrates.[4] In solution, it is a semiflexible polymer, approximately 300 nm in length and 1.5 nm in diameter. One of the major features of type I collagen is its ability to self-assemble into highly organized supramolecular structures, cross-striated fibrils, which, in turn, often form larger entities, namely, fibers and fascicles, which give

*Corresponding authors. E-mail addresses: Gervaise.Mosser@snv.jussieu.fr; Emmanuel.belamie@enscm.fr.

Abbreviations used: TEM, transmission electron microscopy; SEM, scanning electron microscopy; SAXS, small-angle X-ray scattering; FFB, fibril-forming buffer; WAXS, wide-angle X-ray scattering.

0022-2836/$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

living tissues their stability[5,6] and their unique mechanical properties.[7,8] The dimensions and polydispersity of fibrils vary throughout the body. For example, the narrow size distribution of the 20-nm-wide fibrils inside the cornea is a requirement for its transparency.[9–11] Collagen molecules are involved in a remarkable variety of structures ranging from the bone's helical structure[12] to the crimp observed in the tendon.[13] Collagen is thus an ideal "building block" for tissue engineering, provided that a comprehensive understanding of its self-assembly properties can be reached so that the packing of fibrils into artificial biomaterials can be controlled.

Because of the complexity of fibrillogenesis and its dynamic nature, most studies have focused on *in vitro* systems based on the solubility of type I collagen in dilute acids. It can be extracted from tissues such as young rat tail tendon,[14] calfskin,[15] or carp swim bladder tunics.[16] Collagen can reassemble from dilute solutions *in vitro* into fibrils whose microstructure is similar to those observed *in vivo*.[17] However, there has been limited success in rebuilding a bulk material comparable to living tissues at a macroscopic scale.[18–25] The techniques usually involve freeze-drying or air-drying[15,26] at room temperature, thorough dehydration with concentrated polyethylene glycol solutions,[21] or centrifugation of fibrils formed in the dilute state.[27]

Here, we aimed to assess the biochemistry of intrinsic collagen properties involved in self-assembly in the absence of cells. Fibril sizes and morphologies vary widely over a broad concentration range.[18,19] In particular, fibril width decreases from several hundreds of nanometers down to 10 nm as concentration increases from approximately 50 to 1000 mg/ml.[19] To clarify which parameters control the formation of fibrils in the dense state in a simplified, acellular context, we prepared homogeneous samples of known composition in controlled physicochemical conditions to assess the influence of concentration, pH, and ionic strength on the dimensions and distribution of fibrils. In general, fibrillogenesis was induced by raising the pH of concentrated acidic solutions, thus producing hard gels in a dense hydrated state.

Two complementary techniques can be used to characterize fibrils:[28] transmission electron microscopy (TEM) and synchrotron X-ray scattering. TEM provided local structural information on length scales ranging from 15 nm to several micrometers, whereas X-ray scattering gave us global structural information about the packing of collagen molecules within fibrils, on scales ranging from 1 to 50 nm.

We showed that cross-striated collagen fibrils similar to native ones are formed over wide ranges of pH (pH 6–12) and ionic strength (127–1300 mM) and that their size and organization strongly depend on the concentration of the initial acidic solution.

Results

Dependence of fibrillogenesis on collagen concentration

Light transmission

In general, highly concentrated collagen solutions are transparent or translucent and turn opaque when brought to neutral pH (Fig. 1a and b). This is indicative of the formation of fibrils, or large aggregates, that scatter light. Light transmission was therefore used to monitor fibrillogenesis over a range of collagen concentrations. Because of the high viscosity of the most concentrated solutions, fibrillogenesis of this series of samples was induced by ammonia vapor instead of immersion in a buffer.

Below 50 mg/ml collagen, acidic solutions are mostly transparent (T=98–100%) as are the corresponding gels (T=85–92%) (see Fig. 1c). In the 50- to 150-mg/ml range, solutions are also transparent but the gels are very opaque with a light transmission minimum at 150 mg/ml (T=3%), which also corresponds to the largest variation in transmission between initial solution and gel (ΔT=93%). The light transmission of acidic solutions decreases abruptly between 150 and 200 mg/ml and reaches a plateau around T=60%. In the latter range, the corresponding gels show a slight increase in light transmission from 3% to 15–20%.

X-ray scattering study

The presence of fibrils, or large aggregates, produces a strong anisotropic scattering at low angles. The X-ray diffraction patterns of the gels described above are anisotropic because the initial acidic solutions had been shear-aligned before fibrillogenesis (Figs. 2 and 3).

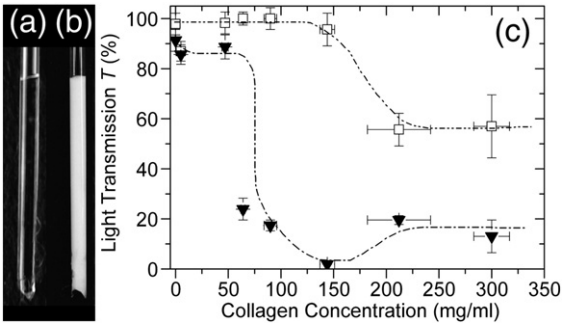


Fig. 1. Comparison of light transmission by initial acidic solutions and fibrillar gels. (a and b) Pictures of a 90-mg/ml collagen solution inserted into a capillary tube, before (a) and after (b) raising the pH, illustrating the radical increase in turbidity induced by fibrillogenesis (diameter of the capillary tube=2 mm). (c) The graph displays the light transmission as a function of collagen concentration for acidic solutions (□) and for neutralized fibrillar gels (▼). Fibrillogenesis in this concentration series was induced by ammonia vapor. Broken lines are guides to the eye.

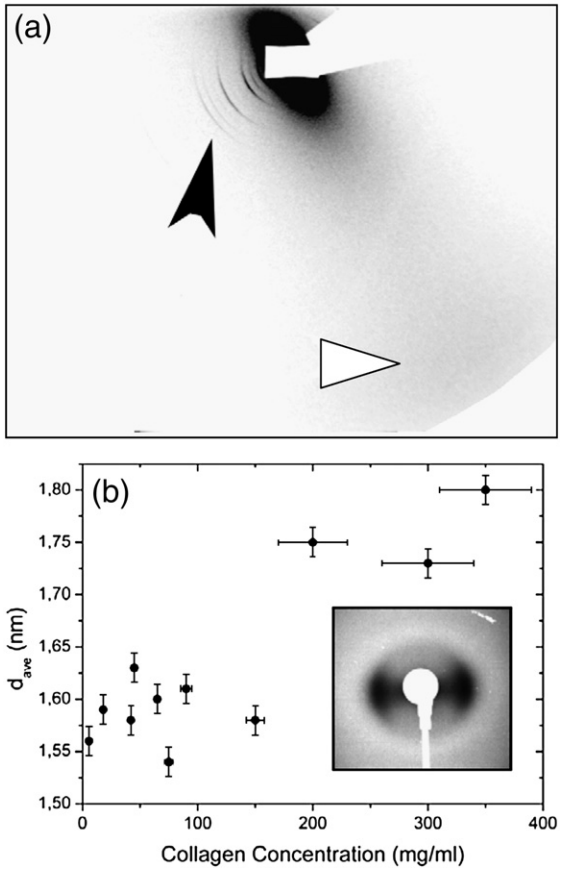


Fig. 2. Anisotropic X-ray scattering patterns of fibrillar gels. (a) SAXS pattern of an aligned fibrillar gel obtained by immersing a 90-mg/ml uniaxial nematic sample into a neutral FFB exhibits three main features: (i) a series of sharp Bragg peaks due to the 67-nm axial periodicity of the staggered packing of triple helices in the fibrils (filled arrowhead), (ii) the in-plane liquid-like correlation peak (open arrowhead), and (iii) an intense anisotropic scattering at very low angles. (b) The graph reports the average distance between triple helices in fibrillar gels as a function of the concentration, as inferred from WAXS pattern (inset).

All gels exhibit a broad in-plane liquid-like (lateral) correlation peak (open arrowhead in Fig. 2a and inset in Fig. 2b) in the 3.8–5.2 nm^{-1} q range ($d_{Bragg} = 2\pi/q = 1.2$–1.7 nm). Assuming a simple local hexagonal packing of the molecules, the average distance between them, d_{ave}, was calculated with the formula $d_{ave} = d_{Bragg} \times 2/\sqrt{3}$. Unexpectedly, d_{ave} increases from 1.6 to 1.8 nm as the concentration increases from 40 to 300 mg/ml (Fig. 2b).

Diffraction peaks corresponding to the 67-nm axial periodicity are also observed (black arrowhead in Fig. 2a, and Fig. 3a), which shows that native-like type I collagen fibrils are formed. As concentration increases, the position of these peaks does not vary, but their relative intensities do. We could detect up to the 30th order, while the 1st order was hidden by the beam stop in our working conditions. The linear intensity profile corresponding to the pattern of Fig. 3a is displayed in Fig. 3b and shows the scattered intensity plotted against the scattering vector modulus q. As previously noted by Kutznetsova and Leikin, the intensity of the 6th-order peak is very strong, whereas it is much lower than the 5th-order peak in natural fibrils.[29] Such an inversion was predicted by Ripamonti *et al.* who calculated the diffraction intensities with an exponential term that accounts for disorder in the telopeptide regions.[30]

Electron microscopy observations

Direct observation of the gels by TEM provides morphological details of gels such as the size of the fibrils and their distribution, orientation, and long-range organization. The presence of native-like 67-nm cross striation was also checked, provided that the fibril width was larger than 30–40 nm.

In the 40- to 80-mg/ml range, fibrils are small and thin (with a length/diameter aspect ratio of approximately 10–20), with little size polydispersity and no preferred orientation (Fig. 4a and b). Their width increases with concentration, from 40 to 80 nm at 40 mg/ml collagen to 80–120 nm at 80 mg/ml. At 100 mg/ml, there is a significant change in the fibril morphology with a much lower aspect ratio of about 4 to 5. Their size can reach up to 1.2 μm in width and 6 μm in length (Fig. 4c). The

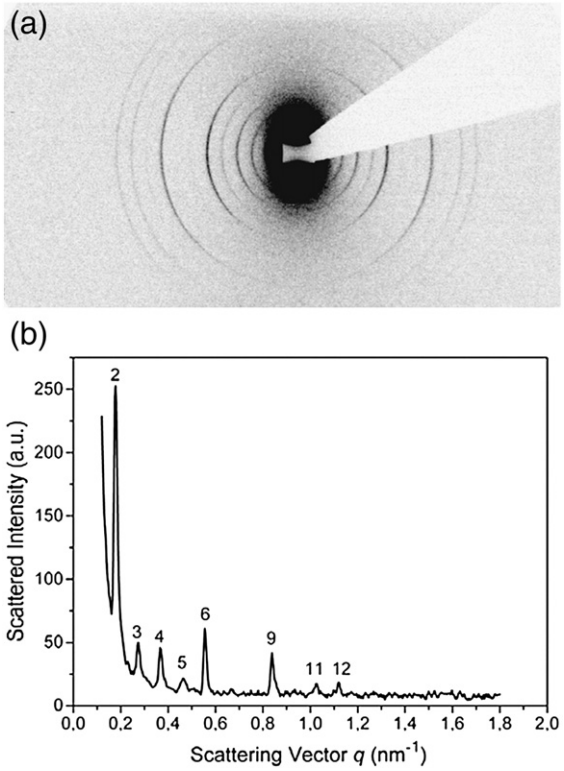


Fig. 3. (a) SAXS pattern of a 145-mg/ml fibrillar gel and (b) the corresponding linear plot of the scattered intensity I as a function of the scattering vector modulus q along the axial (equatorial) direction. The peaks labeled 2–12 correspond to the reflections arising from the staggered stacking of the collagen molecules in the fibrils (67-nm period).

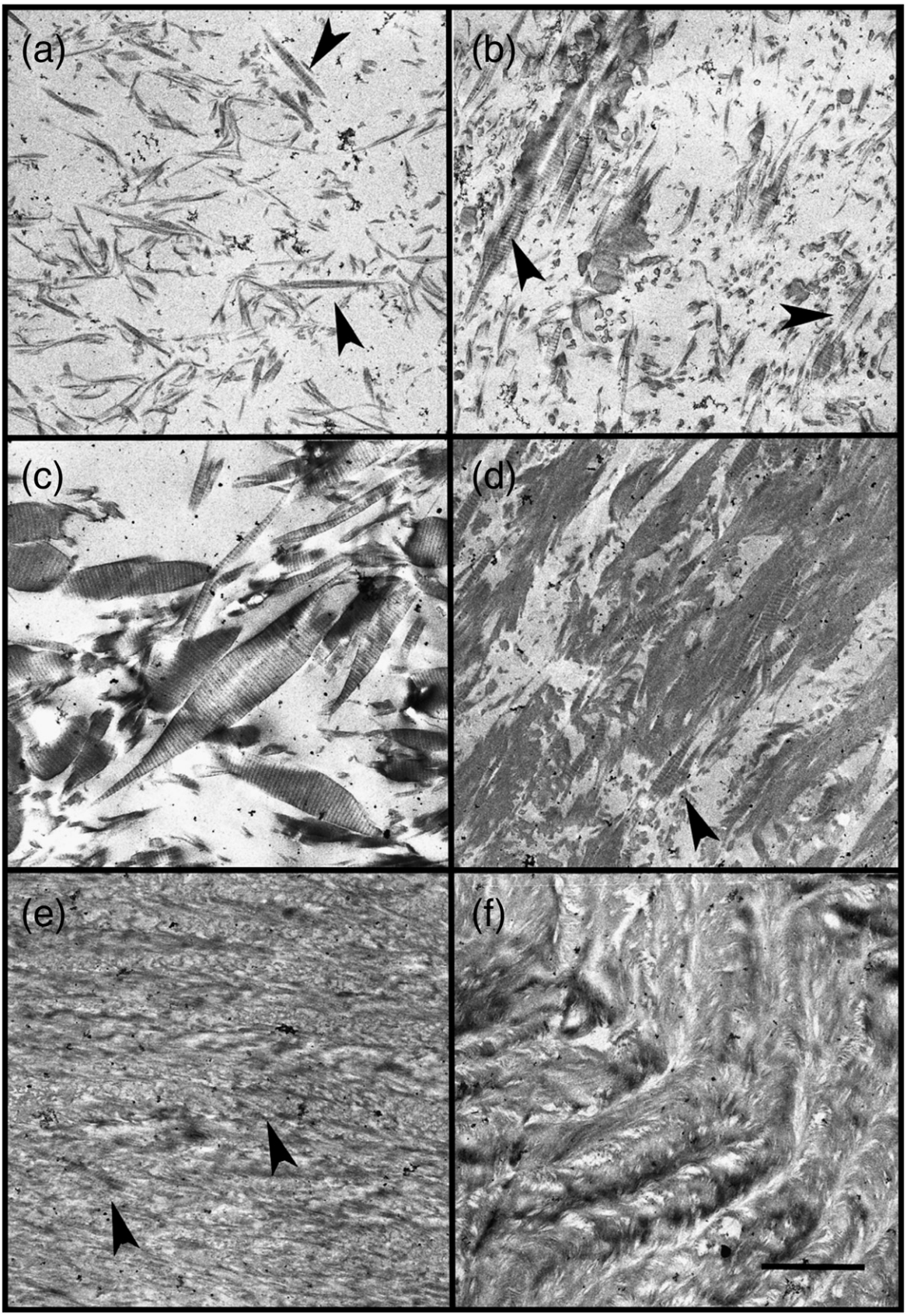


Fig. 4. Influence of collagen concentration on the fibrillar gel structure. Transmission electron micrographs of samples of increasing concentration: (a) 40 mg/ml, (b) 75 mg/ml, (c) 100 mg/ml, (d) ~200 mg/ml, (e) ~300 mg/ml, and (f) ≫300 mg/ml. The arrowheads draw attention to fibrils. The scale bar represents 1.5 μm.

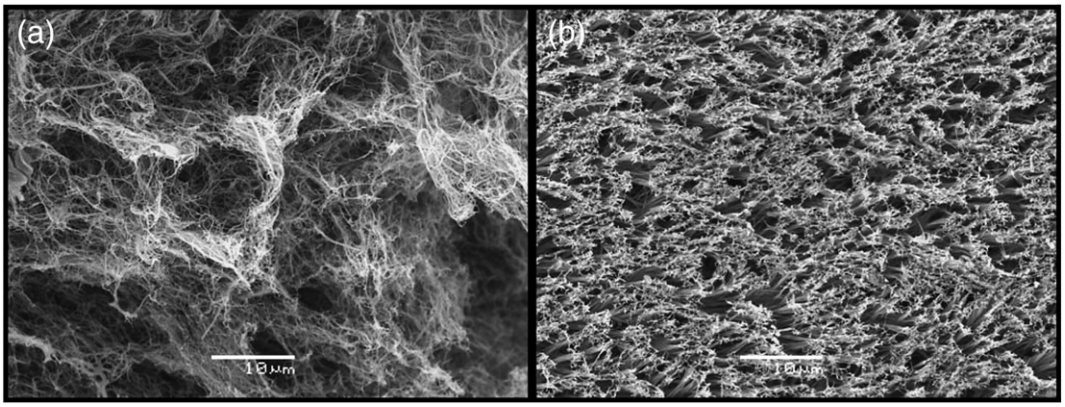


Fig. 5. Scanning electron micrographs of fibrillar gels: (a) 30 mg/ml, (b) 80 mg/ml.

main axes of fibrils can have a preferred orientation imposed by the shearing of the initial solution. From 200 to 300 mg/ml, the fibrils are smaller ($D < 100$ nm, $L \sim 1$ μm) and are distributed more homogeneously (Fig. 4d and e). In the highest concentration range studied, above 300 mg/ml (Fig. 4f), a periodic arced pattern reminiscent of a helical structure[31] is sometimes visible, with a network of small interconnected fibrils.

Scanning electron microscopy (SEM) of gels gave similar results. At 80 mg/ml, fibrils are larger than at 40 mg/ml and lead to a less open porosity of the gel (Fig. 5). Moreover, fibril orientation reflects the molecular order in the initial acidic solutions: isotropic at 40 mg/ml and oriented at 80 mg/ml.

pH dependence of fibrillogenesis

Here, we focused on the pH 6–13 range, where fibrillogenesis is known to occur in dilute solutions[32] at room temperature. This is also the widest range possible when using phosphate buffers. However, acidic collagen solutions dialyzed against acetic acid precipitate at pH values of 4.5 and above (not shown).

Light transmission

Collagen samples immersed in phosphate buffers in the pH 7–12 range give white opaque gels (e.g., $T \sim 20 \pm 4\%$ at 80 mg/ml). Outside this range, namely, at pH 6.2 and 13, the samples are slightly

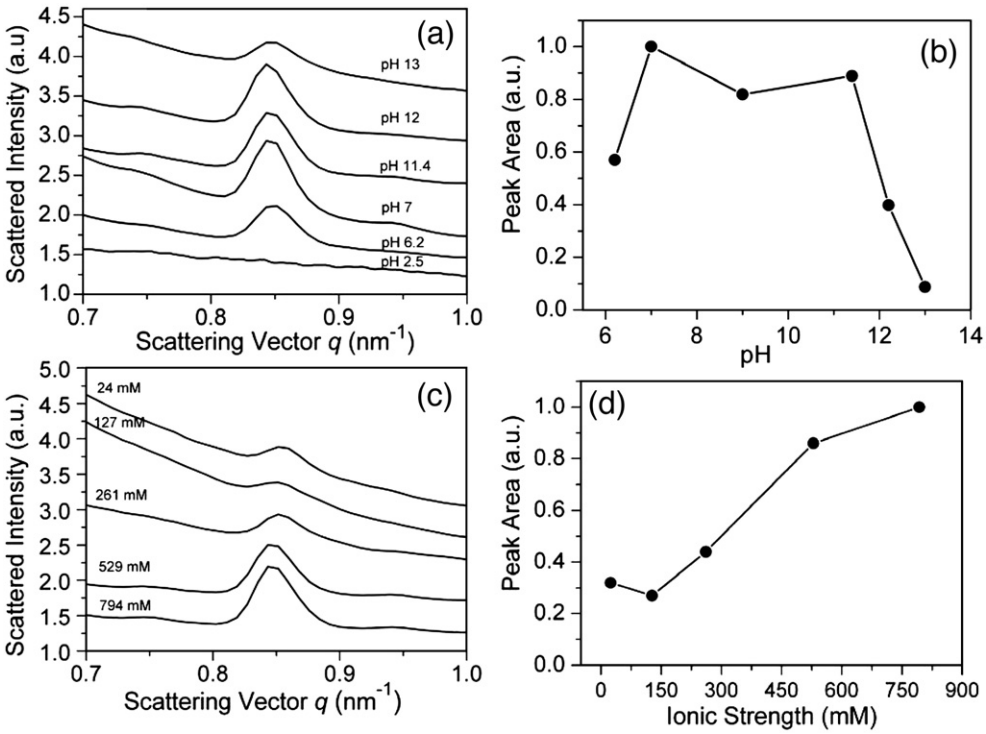


Fig. 6. Close-ups on the ninth harmonic of the 67-nm axial periodicity. (a and b) Linear profiles at different pH (a) and variations of the peak total area as a function of pH (b). (c and d) Linear profiles at different ionic strengths (c) and variations of the peak total area as a function of ionic strength (d). The scattered intensities have been rescaled for the sake of clarity. The average scattered intensity of the peaks is about 8×10^{-3} mm^{-1}. The sample concentration was 150 mg/ml.

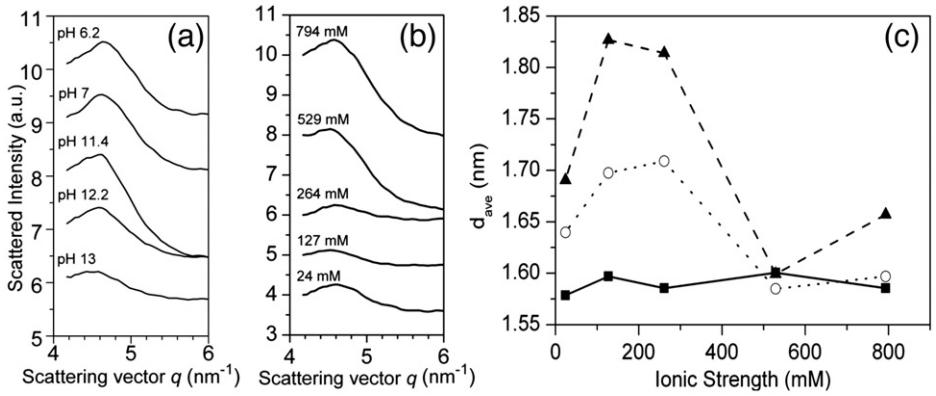


Fig. 7. Linear plots of the lateral correlation peak. Interaxial distance between triple helices in the fibrils shows (a) the influence of the pH of the FFB and (b) the influence of the ionic strength of the FFB, for a 75-mg/ml collagen concentration, with $d_{ave} \sim 1.58 \pm 0.1$ nm. (c) Evolution of the interaxial distance as a function of ionic strength for gels at pH 7.4 and with different initial solutions of concentrations: 75 mg/ml (■), 145 mg/ml (○), and 200 mg/ml (▲).

less opaque (e.g., $T \sim 30 \pm 4\%$ at 80 mg/ml), although they behave macroscopically like gels.

X-ray scattering study

The position and width of the small-angle X-ray scattering (SAXS) peaks ($q = 0.2$–2 nm^{-1}), corresponding to the 67-nm periodic molecular stagger, appear mostly insensitive to pH in the pH 6.2–12.2 range. However, systematic variations in the integrated peak intensity are observed (Fig. 6a and b) with significantly higher values in the pH 7–11.4 range. Note that in acetic acid, fibrils could be detected at pH >5.

The integrated intensity of the liquid-like correlation peak ($d_{ave} \sim 1.55 \pm 0.01$ nm at 75 mg/ml) decreases when the pH is raised above 12.2 (Fig. 7a). The peak position shifts to slightly lower q values, indicating a larger separation between molecules in the fibrils ($d_{ave} \sim 1.62 \pm 0.01$ nm).

TEM observations

Over a wide pH range (pH 6.2–12.2) including physiological pH, cross-striated fibrils are commonly observed (Fig. 8a). At pH 13, fibrillar aggregates are visible, but they usually do not exhibit the typical cross striation. These aggregates have dimensions similar to those of fibrils obtained at the same concentration in the pH 6.2–12.2 range. Small disordered nanofibrils about 6 nm wide (Fig. 8b) are seen all over the field of view.

Dependence of fibrillogenesis on ionic strength

Here, we describe the dependence of fibrillogenesis of a 100-mg/ml collagen solution at pH 7.4 on ionic strength. These conditions yield the strongest X-ray scattering signals (Fig. 3) and well-defined cross-striated fibrils (Figs. 4c and 8a). Experiments using other collagen concentrations gave similar results.

Light transmission

Collagen samples immersed in a neutral phosphate buffer (pH 7.4) yield strong and opaque gels at all ionic strengths above 127 mM ($T = 18 \pm 2\%$), while at the lowest ionic strength studied (24 mM), a loose translucent gel is obtained ($T = 90 \pm 3\%$).

X-ray scattering study

At neutral pH, the staggered packing periodicity is mostly insensitive to ionic strength with an average value of 66.5±0.2 nm. However, the integrated peak intensity increases continuously from

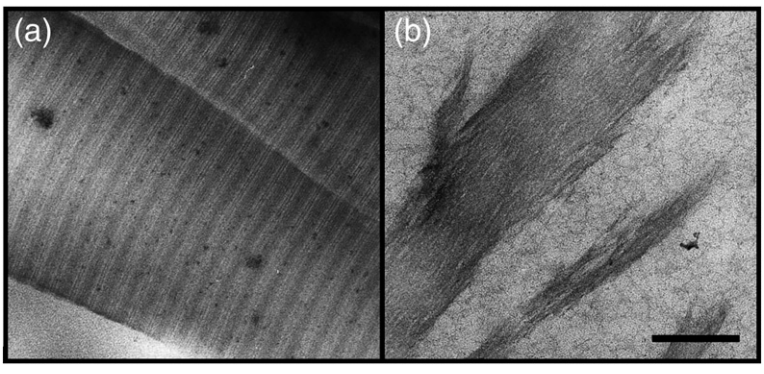


Fig. 8. Influence of pH on the fibrils' morphology. Negatively stained transmission electron micrographs of 100- to 150-mg/ml samples prepared in buffers at different pH. (a) At pH 7.4 (as at pH 6.2, 9, 10.4, and 12.2), the fibrils exhibit the typical 67-nm cross-striated pattern. (b) At pH 13, most aggregates appear as loose bundles of nanofibrils. The scale bar represents 200 nm.

24 to 794 mM (Fig. 6d). Unlike that of the axial periodicity, the position of the liquid-like correlation peak varies significantly with increasing ionic strength for concentrations above 75 mg/ml (Fig. 7c). The separation is largest at intermediate ionic strengths (127–261 mM) and then decreases down to 1.60 nm as the ionic strength is increased to 529 mM.

TEM observations

The gels observed at 24 mM are made of a dense network of nanofibrils, typically 15–20 nm in width and 200–250 nm in length (Fig. 9a and b). Larger scattered fibrils are formed at 124 mM, 60–180 nm in width and 1–2 μm in length (Fig. 9c and d), which exhibit the typical 67-nm striation. At 261 mM, fibrils are even larger (width ~ 200–300 nm, length ~ 3–4 μm, Fig. 9e and f). At higher ionic strengths, 529 mM (Fig. 9g and h) and 1300 mM (Fig. 9i and j), the cross-striated fibrils are aggregated into micrometer-size bundles, as evidenced by the irregular shape of their cross section. At 529 mM, domains with large fibrillar bundles are surrounded by domains composed of nanofibrils (width ~ 40 nm, length ~ 600 nm), while the opposite is observed at 1300 mM. Similar structures were observed when the ionic strength was adjusted by addition of a monovalent salt (see Table 2).

Occurrence of fibrils in highly concentrated acidic solutions

As described in Concentration dependence of fibrillogenesis at acidic pH, concentrated collagen solutions above 150 mg/ml scatter visible light significantly and therefore appear slightly turbid, indicating the presence of aggregates. A few harmonics of the typical 67-nm signal are present in SAXS diffraction patterns (Fig. 10c), clearly indicating the presence of native-like collagen fibrils. In contrast, the interparticle correlation peak is only detected with the most concentrated samples (above 300 mg/ml), where a broad peak is visible in the 3.8–5.2 nm^{-1} range (d_{ave} = 1.4–1.8 nm). TEM observations confirm the presence of striated fibrils embedded

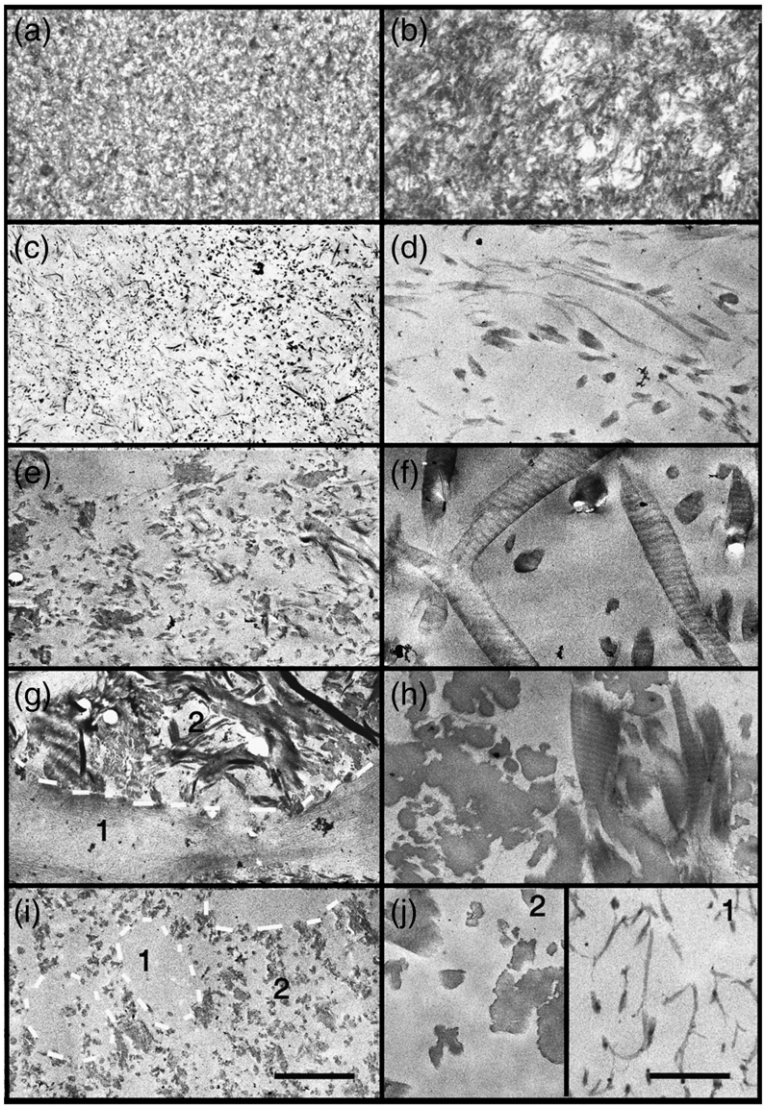


Fig. 9. Influence of ionic strength on the gels' structure. Transmission electron micrographs of samples at 100 mg/ml at different ionic strengths: (a and b) I = 24 mM, (c and d) I = 124 mM, (e and f) I = 261 mM, (g and h) I = 529 mM, and (i and j) I = 1300 mM. Left column: low magnification, scale bar = 3 μm; right column: high magnification, scale bar = 500 nm. "1" and "2" refer to areas with small and large fibrils, respectively. Limits are emphasized by white broken lines.

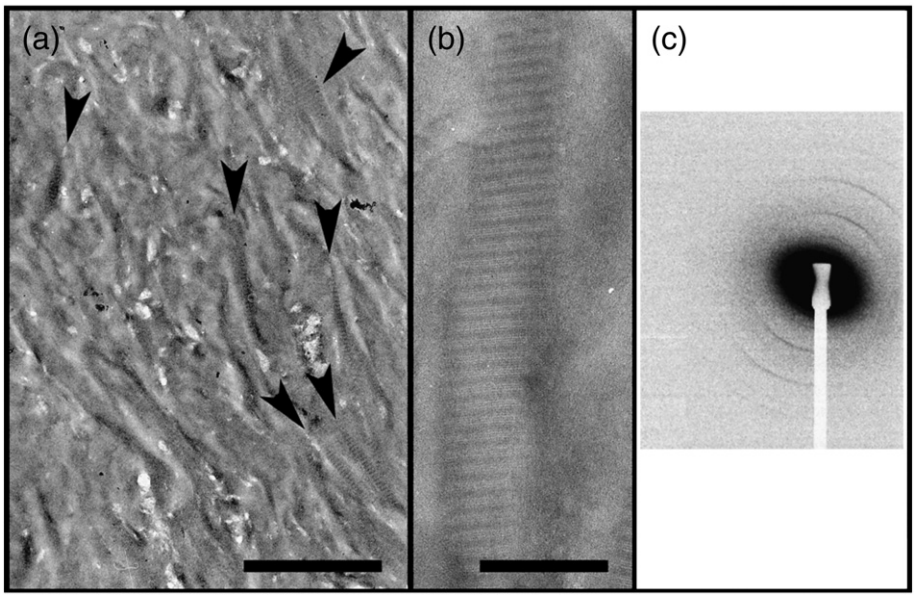


Fig. 10. Fibril formation in a dense acidic sample (about 180 mg/ml in 500 mM acetic acid). Cross-striated fibrils appear embedded in a dense continuous medium. (a) Low magnification. Arrowheads draw attention to some cross-striated fibrils. The scale bar represents 2 μm. (b) High magnification. The scale bar represents 500 nm. (c) SAXS pattern of a 300-mg/ml acidic sample (500 mM acetic acid).

in a dense and homogeneous material (Fig. 10a and b).

Discussion

Concentration dependence of fibrillogenesis at acidic pH

One of the most remarkable properties of collagen solutions is that they form lyotropic liquid-crystal phases above a critical concentration of 80–85 mg/ml when prepared in 500 mM acetic acid.[33,34] While the orientation of collagen triple helices is random in isotropic solutions, a long-range helical organization occurs in the more concentrated cholesteric phase. This chiral phase can be unwound into a uniaxial nematic phase, where molecules are aligned in the same direction, by applying moderate shear stress.[34]

Here, we found that fibrillar aggregates form in acidic solutions above 150 mg/ml. This is demonstrated by SAXS as harmonics of the 67-nm periodicity are visible in the diffraction patterns. In the most concentrated samples (above 300 mg/ml), a broad interparticle correlation peak appears in the 3.8–5.2 nm^{-1} q range (d_{ave} = 1.4–1.8 nm), corresponding to the typical distance between triple helices in native or reconstituted fibrils.[16,35–37] This result is consistent with both the increased turbidity of highly concentrated acidic solutions (Fig. 1) and the TEM observations that show the presence of cross-striated fibrils in an otherwise dense and homogeneous medium (Fig. 10). We previously reported that the correlation length of the liquid-like order in collagen solutions unexpectedly decreases as concentration increases,[34] supporting the idea that the electrostatic interactions, predominantly repulsive at lower volume fractions, may be overcome by attractive forces at high packing densities. This would favor the condensation of triple helices into fibrils. The emergence of highly organized fibrils within the cholesteric phase suggests that a second phase transition occurs at a concentration quite distinct from that of the I/N* transition. Because of their axial periodicity,[38,39] collagen fibrils have often been compared to a smectic A phase. Our results further substantiate this hypothesis, and the appearance of cross-striated fibrils in cholesteric solutions is reminiscent of a cholesteric-to-smectic (N*/SmA) transition, as observed with lyotropic liquid crystals of monodisperse rodlike particles such as viruses.[40,41] The fact that only a limited fraction of the collagen molecules are aggregated into fibrils could be explained by the high viscoelasticity of the collagen solutions that hinder the completion of this process (unpublished data).

Concentration dependence at neutral and basic pH

As the pH is raised, fibrillogenesis induces gelation of the collagen solutions. TEM observations strongly suggest that abutting fibrils share several triple helices or microfibrils (unpublished results, and Ref. 42). The resulting network of interconnected fibrils is likely to give gels their mechanical strength.

It has been shown that fibrillogenesis in dilute solutions (less than 5 mg/ml) proceeds through a lag phase corresponding to nucleation. Within this

concentration range, the lag phase is shortened as collagen concentration is increased. The final state is characterized by a higher turbidity and larger fibrils[43–46] several micrometers in diameter at an optimum temperature.[47] It has been suggested[8,48] that during the lag phase, triple helices form small multimeric intermediates that later aggregate into ordered structures. Fibril growth would then proceed by further addition of multimeric intermediates, the final size being governed by the number of collagen molecules available in solution.

At a 10-mg/ml collagen concentration, Silver *et al.* reported small fibril diameters in the order of only 20–40 nm).[20,49] Here, at 40 and 80 mg/ml, we measured fibril diameters of 40–80 and 80–120 nm, respectively. Altogether, these data suggest that the increase in fibril diameter as a function of collagen concentration might be linear in the 10- to 80-mg/ml range. It should be noted that the fibrils' dimensions are an order of magnitude lower than in the dilute concentration range described above (<5 mg/ml). This suggests that, in this range, the nucleation process is favored over growth, resulting in a rapid depletion of monomeric or oligomeric species[50,51] from the medium, thus limiting the final size of fibrils.

In an intermediate concentration range (90–150 mg/ml), fibril dimensions significantly increase with concentration, with widths up to 1.2 μm and lengths up to 6 μm (Fig. 4c). Interestingly, preliminary rheological data from acidic solutions show a plateau in the same concentration interval (data to be published elsewhere), indicating that the mobility of collagen molecules remains fairly constant over this concentration range. Thus, a possible explanation is that increasing the concentration of collagen molecules in these viscous solutions, while keeping their mobility essentially constant, favors the growth of larger fibrils.

At concentrations higher than 200 mg/ml, fibril diameter drops below 100 nm (Fig. 4d–f), similar to the 10-nm fibrils measured previously at very high concentrations.[19]

The mechanism usually postulated for the formation of collagen fibrils *in vitro* is homogeneous nucleation[52] and a possible role of telopeptides.[29] Both continuous lateral growth and fusion of fibrils may occur,[42] suggesting that there is no self-regulation of the fibril width in the absence of other biological components as long as the medium is continuously fed with collagen molecules. Thus, in normal conditions, the fibril size is most probably governed by the interplay between the concentration of triple helices available in the initial solution and their mobility inside the forming gel.

In summary, the dependence of fibril size on concentration is highly nonmonotonic. The general behavior across the concentration range investigated here and in previous studies is summarized in Table 1, divided into four main regimes of globally increasing or decreasing fibril size. The volume fraction and mobility of molecules and the density of nucleation points are the three main parameters that compete in a complex manner.

Table 1. Sums up the fibrils size dependence upon concentration

Concentration (mg/ml)	Regime	Fibril width	Trend	References
<5	I	Micrometers	↗	44–46
10–80	II	20⇒80 nm	↘	20,49
90–150	III	Micrometers	↗	19 and present article
200–300	IV	~100 nm	↘	19 and present article

The concentration of the initial solution also influences the packing of the triple helices in fibrils. In contrast with most *ex vivo* studies,[21,53,54] the higher the concentration of the initial solution (i.e., the lower the water content), the higher the average distance between molecules inside the fibrils as measured by SAXS (Fig. 2b). To be rigorous, we should not infer the intermolecular distance directly from the position of the correlation peak without taking into account the molecules' form factor, an orientation and a correlation function to fit the diffraction peaks, but this is outside the scope of this article and would affect the results only marginally.

pH dependence of fibrillogenesis

Fibrils assemble spontaneously and are stable over a wide pH range from pH 6.2 to 12, which covers the isoelectric point of collagen (~pH 9). Native-like cross-striated fibrils are formed, yielding strong macroscopic gels with no influence of pH observed in TEM or SAXS assays. The periodic stagger is constant at 66.5 nm and relates to the maximum interaction between oppositely charged side chains and large hydrophobic amino acids of adjacent triple helices.[55,56] In spite of a net charge inversion across the isoelectric point, the same 4D-staggered periodicity is obtained regardless of the pH between pH 5 and pH 12. However, we cannot completely rule out the possibility that fibrils form before the net charge inversion, since the initial solutions are acidic. Indeed, electrostatic forces, which may be responsible for the long-range attraction and organization, might be negligible at close range, compared to other factors such as hydrophobic[32] or van der Waals forces. These nonionic forces would be responsible for the subsequent stability of fibrils above the isoelectric point. Moreover, the bundle-shaped aggregates observed at pH 13 are stable over months, although the calculated net charge (−228 q) is comparable to that at pH 2.5 (+256 q) where collagen is readily soluble. This stability is probably reinforced by intermolecular cross-links that can occur when nonhelical ends, the telopeptides, are present.[21,57]

It should be noted that, unlike our findings, a significant decrease in the average fibril diameter from pH 7.0 down to pH 5.0 has been reported, although this was with much more dilute solutions (10 mg/ml) precipitated in a Tris buffer.[49]

At pH 4.5 in acetic acid or at pH 6 in phosphate buffer, gels form but are weaker than those formed at higher pH. This agrees with measurements of interaction forces between collagen triple helices in preformed fibrils[58] that indicate an attractive contribution that may arise from hydrogen bonding at pH 7.5, which is cancelled out at pH 6. However, we cannot easily compare experiments made in acetic acid with those made in phosphate buffers because of the different ionic strengths and charge effects.

Dependence of fibrillogenesis on ionic strength

Very low ionic strength (24 mM) limits fibril size (width = 15–20 nm, length ~ 100 nm, Fig. 9a and b) and yields weak gels, as found with dilute (<1 mg/ml) solutions at low ionic strength.[32] At sufficiently high collagen concentrations, a dense network of microfibrils is obtained (Fig. 9a and b). The characteristic X-ray scattering signals are weak compared to those obtained at higher ionic strengths (127–261 mM) where the fibrils are larger and aggregated in bundles. This is also supported by previous studies of dilute conditions.[43,44,46] Controlling the size of fibrils at a constant concentration provides a way of adjusting the gel porosity. Indeed, larger fibrils lead to a more open porosity visible in micrographs (Fig. 9). At very high ionic strength (529–1300 mM), large aggregates and nanofibrils coexist. The irregular cross section of the large aggregates suggests that they derive from the fusion/aggregation of smaller fibrils.[49,59] Despite the very high concentration of mobile ions expected to screen the collagen charges, triple helices organize in a well-ordered manner. This is another indication that fibril self-assembly is driven not only by electrostatic charges but also by hydrophobic, nonionic interactions.[30,52,55,60,61]

Positional order of the collagen triple helices in fibrils

Micrographs show that the cross-striated pattern extends over micrometers along the fibrils as is well documented. Indeed, in SAXS patterns, the axial periodicity produces a large number of rather thin diffraction rings, or arcs, that represent high-order harmonics of the 67-nm stagger. However, unexpectedly, these rings are not resolution-limited. They have comparable widths, which suggest the existence of domains in which the 67-nm staggered positional order is quite regular. The domain size (along the fibril axis) can be estimated with the formula $D_{axial}=2\pi/\Delta q$ (Δq being the first-order peak's full width at half maximum) and is at most 1000 nm. This value is surprisingly low with respect to the length (300 nm) of a single triple helix. We made the same observation on the SAXS patterns of rat tail tendons (data not shown).

In contrast, the positional order of the triple helices in the plane perpendicular to the fibril axis is clearly liquid-like because only one very broad maximum could be clearly observed. The lateral liquid-like correlation length is low ($\xi_{lateral}$=4–5 nm) and, surprisingly, does not increase as the fibril diameter increases from 82 nm at 75 mg/ml to 1.2 μm at 145 mg/ml. This low value of $\xi_{lateral}$ is consistent with the idea that a liquid-like order prevails within planes perpendicular to the fibril axes. Besides, this value is also comparable to the size of the oligomeric species, or early aggregates, that would spontaneously form in collagen solutions[50–52,59] and serve as nucleation points for fibril growth. Such microfibrillar subunits composed of five collagen molecules are also found in several models of fibril structure.[62–65]

Conclusions

In concentrated collagen solutions, fibrillogenesis can be induced by the diffusion of fibril-forming buffers (FFBs). We show that it is possible to preserve the long-range organization of the initial acidic liquid-crystalline phase as done previously with ammonia vapor.[18,19]

Native-like fibrils are formed and are stable over a pH range from pH 6.2 to 12.2, despite significant changes in surface electrical charge. In this same pH range, and from 24 to 794 mM ionic strength, fibrils exhibit typical striations observed by TEM. The corresponding X-ray scattering signal is clearly visible with numerous harmonics. In spite of a regular structure that extends over micrometers, the lateral correlation length inferred from diffraction patterns indicates a liquid-like order extending only to nearest neighbors. Likewise, the axial correlation length is less ordered than would be expected from the TEM observations. The collagen concentration of the initial acidic solutions has a definite impact on the size of the fibrils. We consider that the nonmonotonic change in fibril size with collagen concentration probably results from a competition between the availability of molecules and the viscoelasticity of dense solutions. Based on TEM observations and SAXS patterns, fibrils spontaneously form at low pH in highly concentrated collagen solutions, suggesting that there is a phase transition, different from the isotropic–cholesteric phase transition reported previously, which is more like a N*/SmA transition.

Here, we have demonstrated that native-like fibrils are obtained from highly concentrated collagen solutions at neutral pH, yielding fibrillar matrices with collagen volume fractions similar to those of biological tissues such as skin, cornea, tendon, and bone. Although the occurrence of a transient, dense fluid state preceding collagen deposition remains to be proven, the secretion of collagen *in vivo* to form strong tissues certainly occurs in dense, molecularly crowded environments, such as secretion vesicles[50] or plasma membrane folds.[2,50]

Another interesting aspect is the possibility of adjusting the fibril size, and therefore the porosity, by defining the ionic strength of the FFB. Combined

with control over the long-range architecture of the fibrillar gels provided by the liquid-crystal properties of concentrated collagen solutions, these new data should prove useful in developing biomimetic materials for medical applications. Future work will be to characterize the viscoelastic properties of highly concentrated collagen solutions that apparently play a crucial role in the structure of the final matrices. The effect of adjuvant molecules such as decorin,[20] uronic acid (GAG),[66] or other collagen types[67–69] on the morphology and long-range organization of the fibrils will be studied.

Materials and methods

Collagen extraction and purification

Type I collagen was extracted from young Wistar rat tails. Using young rats is preferable because intermolecular cross-linking in collagen fibrils increases with age, reducing the solubility. The tendons were excised in a sterile flow hood and washed with phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.07 mM Na_2HPO_4, and 1.47 mM NaH_2PO_4) to remove cells and traces of blood. The tissues were then soaked in a 4-M NaCl solution to lyse remaining cells and precipitate some of the high-molecular-weight proteins. After the tendons were rinsed again with phosphate-buffered saline, they were solubilized in 500 mM acetic acid. The solution was clarified by centrifugation at 41,000×*g* for 2 h. Proteins other than type I collagen were selectively precipitated in 300 mM NaCl and removed by centrifugation at 41,000×*g* for 3 h. Collagen was retrieved from the supernatant by precipitation in 600 mM NaCl and centrifugation at 3000×*g* for 45 min. The pellets were solubilized in 500 mM acetic acid and thoroughly dialyzed against the same solvent to completely remove NaCl. The solutions were kept at 4 °C and centrifuged at 41,000×*g* for 4 h before use. Sample purity was assessed by SDS-PAGE electrophoresis. Given the quantities necessary for our experiments, very stringent purification was not possible and there may have been traces of other components.

Sample preparation

Collagen solutions of different concentrations were prepared by reverse dialysis against polyethylene glycol (35 kDa, Fluka) dissolved in 500 mM acetic acid up to 50% (w/v). Collagen concentration was determined from the acidic solution before fibrillogenesis by assessing the amount of hydroxyproline.[70]

We have previously shown[19,33,34] that solutions of concentrations larger than 90 mg/ml exhibit liquid crystallinity. Such samples, when not too viscoelastic, were aligned before fibrillogenesis by sucking them into capillary tubes (i.e., with the collagen triple helices oriented parallel with the capillary tube axis). The tubes, which are open at both ends, were immersed in different phosphate FFBs for at least 48 h to induce fibrillogenesis. The collagen solutions did not leak out of the tubes; hence, we considered that no dilution occurred during this step. When the pH of the phosphate FFB was adjusted to values within the pH 6.2–13 range, the ionic strength (I) was fixed at 587 mM. Inversely, when the ionic strength was varied, the pH was fixed at pH 7.4. The ionic strength was adjusted either by increasing the concentration of the phosphate buffer from 10 to 500 mM or by adding NaCl to a 200-mM phosphate buffer (Table 2). Additional samples were prepared at pH 4, 4.5, and 5, by dialysis of the collagen solution against 500 mM acetic acid. For the latter conditions, since the pH was adjusted by adding a few drops of 10 M NaOH, the ionic strength roughly corresponds to the dissociation of the acetic acid and is close to 3 mM.

Gels were inserted into cylindrical glass capillary tubes that were flame-sealed to keep the samples hydrated and were stored at 4 °C.

All manipulations including fibrillogenesis were performed at 20 °C.

X-ray scattering

X-ray scattering experiments were performed on the ID02 station at the European Synchrotron Radiation Facility with a combined SAXS–wide-angle X-ray scattering (WAXS) setup in order to detect two types of signals characteristic of collagen fibrils. We investigated the scattering from collagen gels in a wide q range, from 0.1 to 40 nm^{-1}, using a monochromatic synchrotron radiation ($\lambda = 0.0995$ nm). The sample-to-detection distance was either 1.23 or 3.00 m. Two-dimensional SAXS patterns were recorded using an X-ray image intensifier lens coupled to a fast-readout CCD (FreLoN) camera with a typical exposure time of 1 s. The sample-to-detection distance for the WAXS geometry was 0.1075 m, and the WAXS detector consisted of an MCP-based XRII (Proxitronic) lens coupled to a 16-bit (14 bit above noise floor) Princeton frame transfer MPP CCD. Appropriate corrections were made, and the data were analyzed with Fit2d (European Synchrotron Radiation Facility) and Image (LPS, Orsay) software. The typical 67-nm periodicity of fibrillar type I collagen was detected with the dense gels inserted in cylindrical glass capillary X-ray tubes and placed directly in the synchrotron beam. The beam dimensions at the specimen were 200 μm × 400 μm, and the sample width was approximately 1 mm; hence, the volume probed was ~0.08 mm^3.

Additional WAXS experiments were carried out with a rotating anode generator operated at 50 kV–40 mA. The X-ray beam was monochromatized ($\lambda_{CuK\alpha} = 0.1541$ nm) and focused by reflection using a double-bent graphite monochromator. The sample-to-detection distance was 10 cm. The scattered X-rays were detected by imaging

Table 2. Composition of the different FFB used to study the role of the ionic strength

	I (mM)										
	24	127	261	522	529	793	600	800	1000	1200	1300
Na_2HPO_4	10	50	100	100	200	300	200	200	200	200	500
NaCl	0	0	0	258	0	0	70	271	474	677	0

plates placed with the sample in an evacuated Unicam camera.

TEM and SEM

Collagen gels were fixed successively in 2.5% glutaraldehyde and in 2% osmium tetraoxide in cacodylate buffer (0.025 and 0.1 M, respectively) at pH 7.4 and 4 °C for 60 min each. For TEM, the samples were then progressively dehydrated through an ethanol series (50%, 70%, 95%, and 100%) before embedding in Araldite for ultrathin sectioning (Ultracut Reichert Young). The 70-nm-thick sections were deposited on copper grids, stained with phosphotungstic acid, and observed with a Philips CM12 electron microscope operated at 120 kV. Because of the rather wide size distributions and the fibril orientations in the ultrathin sections, the fibril dimensions given in the text are only estimates based on measurements made on several representative micrographs. For SEM, the samples were dehydrated in an ethanol series (60%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 100%) and then dried in a Bal-Tec 030 critical point dryer before sputter coating with a 2-nm layer of gold. The samples were observed on a JEOL JSM-5510 LV microscope operated at 10 kV, with a sample-to-detector distance of 12–15 mm.

Light transmission

Measurements of light transmission were used to estimate both the absorption and the scattering of light by the samples before and after fibrillogenesis. Turbidimetry is the usual method for following fibrillogenesis kinetics in the dilute state[48,59,69]; thus, we roughly assessed the turbidity of gels and solutions by measuring the light transmission.

Samples were put in 100-μm-thick quartz chambers and observed with a Nikon Eclipse E600Pol transmission sodium light microscope, equipped with a DXM 1200 CCD camera. Pictures were saved in 1280 × 1024 pixel jpeg files. The transmission was estimated with the ImageJ[71] free software†, which calculates area statistics in subregions of the image. RGB pixels were then converted to brightness values using the formula $V=(R+G+B)/3$. About 20 measurements were made in different homogeneous regions of each sample. Solutions were kept inside the quartz chamber and exposed to phosphate buffer or to ammonia vapor overnight to induce fibrillogenesis. The latter procedure was necessary for the most concentrated samples and, therefore, used for the measurements of light transmission of the concentration series. In this particular case, neither the ionic strength nor the pH could be easily controlled. The ammonia vapor was produced by a 30% NH_4OH solution placed with the sample in a closed chamber. One hundred percent transmission corresponds to that of 500 mM acetic acid.

Acknowledgements

The authors are grateful to Nadine Nassif for SEM and to Rachel Carol for carefully reading and revising the manuscript.

† http://rsb.info.nih.gov/ij/

References

1. Veit, G., Kobbe, B., Keene, D. R., Paulsson, M., Koch, M. & Wagener, R. (2006). Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J. Biol. Chem.* **281**, 3494–3504.
2. Canty, E. G. & Kadler, K. E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **118**, 1341–1353.
3. Woodhead-Galloway, J. (1980). Collagen: the anatomy of a protein. In *Studies in Biology*, vol. 117. London: Edward Arnold.
4. Engel, J. (1997). Versatile collagen in invertebrates. *Science*, **277**, 1785–1786.
5. Leikina, E., Mertts, M. V., Kuznetsova, N. & Leikin, S. (2002). Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 1314–1318.
6. Persikov, A. V. & Brodsky, B. (2002). Unstable molecules form stable tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 1101–1103.
7. Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H. & Bernstorff, S. (1997). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J. Struct. Biol.* **122**, 119–122.
8. Silver, F. H. (1987). *Biological Materials: Structure, Mechanical Properties and Modeling of Soft Tissues.* NYU Press, New York, NY.
9. Coulombre, J. & Coulombre, A. (1975). Corneal development, treatment of five-day-old embryos of domestic fowl with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON). *Dev. Biol.* **45**, 291–303.
10. Bloom, W. & Fawcett, D. W. (1968). In *A Textbook of Histology.* pp. 780, 9th edit. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
11. Meek, K. M. & Fullwood, N. J. (2001). Corneal and scleral collagens—a microscopist's perspective. *Micron*, **32**, 261–272.
12. Giraud-Guille, M.-M. (1988). Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif. Tissue Int.* **42**, 167–180.
13. Dlugosz, J., Gathercole, L. J. & Keller, A. (1978). Transmission electron microscope studies and their relation to polarizing optical microscopy in rat tail tendon. *Micron*, **9**, 71–82.
14. Chandrakasan, G., Torchia, D. A. & Piez, K. A. (1976). Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solutions. *J. Biol. Chem.* **251**, 6062–6067.
15. Gross, J., Highberger, J. H. & Schmitt, F. O. (1955). Extraction of collagen from connective tissue by neutral salt solutions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **41**, 1–7.
16. Boedtker, H. & Doty, P. (1956). The native and denatured states of soluble collagen. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4267–4280.
17. Nageotte, J. (1927). Action des sels neutres sur la formation du caillot artificiel de collagène. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, **96**, 828–830.
18. Besseau, L. & Giraud-Guille, M.-M. (1995). Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelated matrices. *J. Mol. Biol.* **251**, 197–202.
19. Mosser, G., Anglo, A., Helary, C., Bouligand, Y. & Giraud-Guille, M.-M. (2006). Dense tissue-like collagen matrices formed in cell-free conditions. *Matrix Biol.* **25**, 3–13.
20. Pins, G. D., Christiansen, D. L., Patel, R. & Silver, F. H. (1997). Self-assembly of collagen fibers: influence of

fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophys. J.* **73**, 2164–2172.
21. Leikin, S., Rau, D. C. & Parsegian, V. A. (1994). Direct measurement of forces between self-assembled proteins. Temperature-dependent exponential forces between collagen triple helices. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 276–280.
22. Leonard, D. W. & Meek, K. M. (1997). Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma. *Biophys. J.* **72**, 1382–1387.
23. Cavallaro, J. F., Kemp, P. D. & Kraus, K. H. (1993). Collagen fabrics as biomaterials. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 781–791.
24. Bell, E., Ivarsson, B. & Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 1274–1278.
25. Knight, D. P., Nash, L., Hu, X. W., Haffegee, J. & Ho, M. W. (1998). *In vitro* formation by reverse dialysis of collagen gels containing highly oriented arrays of fibrils. *J. Biomed. Mater. Res.* **41**, 185–191.
26. Falini, G., Fermani, S., Foresti, E., Parma, B., Rubini, K., Sidoti, M. C. & Roveri, N. (2004). Films of self-assembled purely helical type I collagen molecules. *J. Mater. Chem.* **14**, 2297–2302.
27. McPherson, J. M., Wallace, D. G., Sawamura, S. J., Conti, A., Condell, R. A., Wade, S. & Piez, K. A. (1985). Collagen fibrillogenesis *in vitro*: a characterization of fibril quality as a function of assembly conditions. *Collagen Relat. Res.* **5**, 119–135.
28. Woodhead-Galloway, J. (1982). Structure of the collagen fibril: an interpretation. In *Collagen in Health and Disease, Chapter 3* (Weiss, J. B. & Jayson, M. I. V., eds), pp. 28–48, Churchill, Livingstone, Edinburgh.
29. Kuznetsova, N. & Leikin, S. (1999). Does the triple helical domain of type I collagen encode molecular recognition and fiber assembly while telopeptides serve as catalytic domains? *J. Biol. Chem.* **274**, 36083–36088.
30. Ripamonti, A., Roveri, N., Braga, D., Hulmes, D. J. S., Miller, A. & Timmins, P. A. (1980). Effects of pH and ionic strength on the structure of collagen fibrils. *Biopolymers*, **19**, 965–975.
31. Bouligand, Y. (1972). Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue Cell*, **4**, 189–217.
32. Cooper, A. (1970). Thermodynamic studies of the assembly *in vitro* of native collagen fibrils. *Biochem. J.* **118**, 355–365.
33. Giraud-Guille, M.-M. (1992). Liquid crystallinity in condensed type I collagen solutions—a clue to the packing of collagen in extracellular matrices. *J. Mol. Biol.* **224**, 861–873.
34. Gobeaux, F., Belamie, E., Mosser, G., Davidson, P., Panine, P. & Giraud-Guille, M.-M. (2007). Cooperative ordering of collagen triple helices in the dense state. *Langmuir*, **23**, 6411–6417.
35. Ramachandran, G. N. & Ramakrishnan, C. (1976). Molecular structure. In *Biochemistry of Collagen* (Ramachandran, G. N. & Reddi, A. H., eds), pp. 45–84, Plenum, New York.
36. Rich, A. & Crick, F. H. C. (1961). The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.* **3**, 483–506.
37. Wilkinson, S. J. & Hukins, D. W. L. (1999). Determination of collagen fibril structure and orientation in connective tissues by x-ray diffraction. *Radiat. Phys. Chem.* **56**, 197–204.
38. Hukins, D. W. L. & Woodhead-Galloway, J. (1977). Collagen fibrils as examples of smectic A biological fibres. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **41**, 33–39.
39. Hukins, D. W. L. & Woodhead-Galloway, J. (1978). Liquid-crystal model for the organization of molecules in collagen fibrils. *Biochem. Soc. Trans.*, 238–239.
40. Wen, X., Meyer, R. B. & Caspar, D. L. D. (1989). Observation of smectic-A ordering in a solution of rigid-rod-like particles. *Phys. Rev. Lett.* **63**, 2760–2763.
41. Dogic, Z. & Fraden, S. (1997). Smectic phase in a colloidal suspension of semiflexible virus particles. *Phys. Rev. Lett.* **78**, 2417–2420.
42. Cisneros, D. A., Hung, C., Franz, C. M. & Muller, D. J. (2006). Observing growth steps of collagen self-assembly by time-lapse high-resolution atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **154**, 232–235.
43. Gross, J. & Kirk, D. (1958). The heat precipitation of collagen from neutral salt solutions: some rate-regulating factors. *J. Biol. Chem.* **233**, 355–360.
44. Wood, G. C. & Keech, M. K. (1960). The formation of fibrils from collagen solutions. 1. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. *Biochem. J.* **75**, 588–596.
45. Wood, G. C. (1960). The formation of fibrils from collagen solutions. 2. A mechanism of collagen-fibril formation. *Biochem. J.* **75**, 598–605.
46. Cassel, J. C., Mandelkern, L. & Roberts, D. E. (1962). The kinetics of the heat precipitation of collagen. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **57**, 556–575.
47. Brokaw, J. L., Doillon, C. J., Hahn, R. A., Birk, D. E., Berg, R. A. & Silver, F. H. (1985). Turbidimetric and morphological studies of type I collagen fibre self-assembly *in vitro* and the influence of fibronectin. *Int. J. Biol. Macromol.* **7**, 135–140.
48. Gross, J. & Kirk, D. (1958). The heat precipitation of collagen from neutral salt solutions: some rate-regulating factors. *J. Biol. Chem.* **233**, 355–360.
49. Christiansen, D. L., Huang, E. K. & Silver, F. H. (2000). Assembly of type I collagen: fusion of fibril subunits and the influence of fibril diameter on mechanical properties. *Matrix Biol.* **19**, 409–420.
50. Trelstad, R. L. (1975). Collagen fibrillogenesis *in vitro* and *in vivo*: the existence of unique aggregates and the special state of the fibril end. In *Extracellular Matrix Influences on Gene Expression* (Slavkin, H. C. & Greulich, R. C., eds), pp. 331–339, Academic Press Inc., San Francisco, CA.
51. Silver, F. H. & Trelstad, R. L. (1980). Type I collagen in solution, structure and properties of fibril fragments. *J. Biol. Chem.* **255**, 9427–9433.
52. Comper, W. D. & Veis, A. (1977). The mechanism of nucleation for *in vitro* collagen fibrils formation. *Biopolymers*, **16**, 2113–2131.
53. Sasaki, N., Shiwa, S., Yagohara, S. & Hikichi, K. (1983). X-ray diffraction studies on the structure of hydrated collagen. *Biopolymers*, **22**, 2539–2547.
54. Huang, Y. & Meek, K. M. (1999). Swelling studies on the cornea and sclera: the effects of pH and ionic strength. *Biophys. J.* **77**, 1655–1665.
55. Hulmes, D. J. S., Miller, A., Parry, D. A. D., Piez, K. A. & Woodhead-Galloway, J. (1973). Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.* **79**, 137.
56. Trus, B. L. & Piez, K. A. (1976). Molecular packing of collagen: three-dimensional analysis of electrostatic interactions. *J. Mol. Biol.* **108**, 705–732.
57. Ricard-Blum, S. & Ville, G. (1989). Collagen cross-linking. *Int. J. Biochem.* **21**, 1185–1189.

58. Leikin, S., Rau, D. C. & Parsegian, V. A. (1995). Temperature-favoured assembly of collagen is driven by hydrophilic not hydrophobic interactions. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 205–210.
59. Trelstad, R. L., Hayashi, K. & Gross, J. (1976). Collagen fibrillogenesis: intermediate aggregates and suprafibrillar order. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 4027–4031.
60. Wallace, D. (1985). The role of hydrophobic bonding in collagen fibril formation: a quantitative model. *Biopolymers*, **24**, 1705–1720.
61. Wen Hu, X., Knight, D. P. & Grant, R. A. (1996). The effect of deamination and/or blocking arginine residues on the molecular assembly of acid-extracted rat tail tendon collagen. *Tissue Cell*, **28**, 215–222.
62. Smith, J. W. (1968). Molecular pattern in native collagen. *Nature (London)*, **219**, 157–158.
63. Miller, A. & Parry, D. A. D. (1973). Structure and packing of microfibrils in collagen. *J. Mol. Biol.* **75**, 441–447.
64. Piez, K. A. & Trus, B. (1981). A new model for packing of type-I collagen molecules in the native fibrils. *Biosci. Rep.* **1**, 801–810.
65. Orgel, J. P. R. O., Irwing, T. C., Miller, A. & Wess, T. J. (2006). Microfibrillar structure of type I collagen *in situ*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1003**, 9001–9005.
66. Parry, D. A. D., Flint, M. H., Gillard, G. C. & Craig, A. S. (1982). A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. *FEBS Lett.* **149**, 1–7.
67. Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Doane, K. J. & Linsenmayer, T. F. (1990). Collagen fibrillogenesis *in vitro*: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J. Cell Sci.* **95**, 649–657.
68. Birk, D. E. (2001). Type V collagen: heterotropic I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*, **32**, 223–237.
69. Hansen, U. & Bruckner, P. (2003). Macromolecular specificity of collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 37352–37359.
70. Bergman, I. & Loxley, R. (1963). Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* **35**, 1961–1965.
71. Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J. & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* **11**, 26–42.

PHASES DENSES DE COLLAGÈNE DE TYPE I : TRANSITION ISOTROPE/CHOLESTERIQUE, FIBRILLOGENÈSE ET MINÉRALISATION

L'objectif de ce travail consiste en l'étude *in vitro* des phénomènes d'auto-assemblage des molécules de collagène de type I en phases denses.

Dans un premier temps nous nous sommes consacrés à l'étude de solutions colloïdales de collagène solubilisé en milieu acide. Nous avons étudié la transition isotrope/cholestérique ainsi que la structure de la phase cristal-liquide obtenue à l'aide de la microscopie optique à lumière polarisée et de la diffusion des rayons X aux petits angles. De plus, nous avons décrit les propriétés rhéologiques de ces solutions à l'aide d'expériences en régime oscillant en géométrie cône-plan.

Ensuite, nous avons cherché à déterminer l'influence de quelques paramètres physico-chimiques simples sur la formation de gels fibrillaires à partir des solutions acides (la « fibrillogenèse »). Ces gels ont été caractérisés par diffusion des rayons X et microscopi électronique à transmission sur coupes ultrafines. Enfin, nous présentons quelques expériences de minéralisation de ces matrices fibrillaires ordonnées ; nous y montrons comment nous avons réussi à obtenir une phase minérale coalignée avec la phase organique.

Ce travail s'inscrit dans un contexte plus large de compréhension de la morphogenèse tissulaire et de la synthèse de biomatériaux ordonnés.

Mots-clefs : Collagène, Auto-assemblage, Cristal-Liquide, Transition Isotrope/Cholestérique, Fibrillogenèse, Minéralisation.

TYPE I COLLAGEN IN THE DENSE STATE : ISOTROPIC/CHOLESTERIC TRANSITION, FIBRILLOGENESIS AND MINERALIZATION

The aim of this work is the *in vitro* study the self-assembly properties of collagen molecules in dense phases.

First, we focused on acidic colloidal suspensions of collagen. We studied the isotropic/cholesteric (I/N*) transition as well as the structure of the liquid-crystalline phase thus obtained. For this we used polarized light optical microscopy and small angle X-ray scattering. Moreover, we described the rheological properties of these solutions through oscillating experiments with a cone-plane rheometer.

Then we studied the influence of simple physico-chemical parameters on the formation of fibrillar gels resulting from the neutralization of acidic solution (« fibrillogenesis »). These gels were characterized by X-ray scattering and Transmission Electron Microscopy on ultrathin sections. Finally, we present some results concerning the mineralization of such ordered fibrillar matrices ; in particular, we highlight the coalignment of a hydroxyapatite phase along with the organic one.

This work takes place in a wider context of tissue morphogenesis comprehension and of ordered biomaterials synthesis.

Keywords : Collagen, Self-assembly, Liquid Crystal, Isotropic/cholesteric transition, Fibrillogenesis, Mineralization.