



HAL
open science

Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I

Aurélien Tidu

► **To cite this version:**

Aurélien Tidu. Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I. Matériaux. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066472 . tel-01508532

HAL Id: tel-01508532

<https://theses.hal.science/tel-01508532>

Submitted on 14 Apr 2017

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED 397 - Physique et Chimie des Matériaux

Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP) - UMR 7574

Synthèse d'une cornée artificielle à base de collagène I

Par Aurélien TIDU

Thèse de doctorat en Biomatériaux

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2016

Devant un jury composé de :

| | | |
|----------------------------|-------------------------|---------------------|
| Gervaise MOSSER | Chargée de Recherche | Directrice de thèse |
| Emmanuel BELAMIE | Directeur d'Etudes | Rapporteur |
| Catherine MOALI | Directrice de Recherche | Rapporteur |
| Vincent BORDERIE | Professeur | Examineur |
| Costantino CRETON | Directeur de Recherche | Examineur |
| May GRIFFITH | Professeur | Examinatrice |
| Valérie LEMARCHANDEL | Directrice Scientifique | Examinatrice |
| Marie-Claire SCHANNE-KLEIN | Directrice de Recherche | Examinatrice |

Table des matières

| | |
|---|----|
| Sommaire | i |
| Remerciement | v |
| Glossaire | ix |
| | |
| Introduction générale | 1 |
| 1 Introduction - Etat de l'art | 7 |
| 1.1 La famille des collagènes | 7 |
| 1.1.1 Le collagène I | 8 |
| 1.1.2 Des fibrilles aux structures hiérarchiques | 10 |
| 1.1.3 La fibrillogenèse <i>in vitro</i> | 13 |
| 1.1.4 Les phases cristal-liquides et le collagène | 13 |
| 1.2 Ingénierie tissulaire de la cornée | 22 |
| 1.2.1 Anatomie et physiologie de la cornée | 22 |
| 1.2.2 Développement des différentes couches de la cornée | 31 |
| 1.2.3 Innervation de la cornée | 33 |
| 1.2.4 Réactions de la cornée aux blessures | 35 |
| 1.3 Etat de l'art : cornée artificielle | 36 |
| 1.3.1 Cornées artificielles déjà utilisées ou en essai clinique | 37 |
| 1.3.2 Matériaux basés sur l'auto assemblage par les cellules | 40 |
| 1.3.3 Utilisation de cellules souches | 41 |
| 1.3.4 Biomatériaux : matrice avec cellules | 41 |
| 1.3.5 Matériaux biomimétiques comme supports pour la régénération | 42 |
| 1.4 Conclusion | 46 |
| 2 Matériaux et méthodes | 49 |
| 2.1 Obtention des solutions de collagène | 49 |
| 2.1.1 Extraction du collagène | 49 |
| 2.1.2 Dosage de la solution de collagène | 49 |
| 2.1.3 Pureté de la solution de collagène | 50 |
| 2.1.4 Ajustement de la condition physico-chimique | 52 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 2.2 | Concentration du collagène | 53 |
| 2.2.1 | Pour la fabrication des matrices denses de collagène fibrillé | 53 |
| 2.2.2 | Pour l'étude des phases cristal-liquides en lumière polarisée | 54 |
| 2.3 | Techniques de caractérisation de la microstructure | 55 |
| 2.3.1 | Techniques classiques utilisant les rayonnements photoniques | 55 |
| 2.3.2 | Génération de seconde harmonique | 59 |
| 2.3.3 | Techniques utilisant le rayonnement électronique..... | 68 |
| 2.3.4 | Mesures mécaniques..... | 74 |
| 2.4 | Techniques de culture cellulaire | 78 |
| 2.4.1 | Cornées provenant des donneurs | 78 |
| 2.4.2 | Membranes amniotiques | 78 |
| 2.4.3 | Culture cellulaire..... | 79 |
| 2.4.4 | Coupes histologiques et colorations..... | 82 |
| 2.5 | Conclusion..... | 83 |
| 3 | Caractérisation des phases cristal-liquides | 87 |
| 3.1 | Protocole expérimental | 87 |
| 3.1.1 | Conditions analysées | 88 |
| 3.1.2 | Préparation des échantillons..... | 88 |
| 3.2 | Analyse par lumière polarisée..... | 88 |
| 3.2.1 | Imagerie en lumière polarisée..... | 89 |
| 3.2.2 | Discussion | 90 |
| 3.3 | Analyse par SHG | 91 |
| 3.3.1 | Introduction | 91 |
| 3.3.2 | Calculs analytiques et simulations numériques..... | 92 |
| 3.3.3 | Résultats numériques et expérimentaux | 93 |
| 3.3.3.1 | <i>Calculs des images P-SHG pour une structure en contreplaqué</i> | 93 |
| 3.3.4 | Discussion | 100 |
| 3.4 | Analyse par microscopie électronique | 102 |
| 3.4.1 | Introduction | 102 |
| 3.4.2 | Cryo-SEM FEG..... | 102 |
| 3.4.3 | Microscopie électronique à transmission | 102 |
| 3.5 | Caractérisation rhéologique des solutions organisées | 106 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.5.1 | Conditions donnant une organisation cholestérique | 106 |
| 3.5.2 | Condition 23 : solution organisée en contreplaqué | 107 |
| 3.5.3 | Comparaison des différentes conditions..... | 108 |
| 3.6 | Conclusions | 113 |
| 4 | Caractérisation des matrices | 117 |
| 4.1 | Transparence des matrices fibrillées. | 117 |
| 4.1.1 | Influence de la condition physico-chimique | 117 |
| 4.1.2 | Influence de la concentration des matrices..... | 118 |
| 4.1.3 | Influence du temps de fibrillogénèse..... | 119 |
| 4.1.4 | Influence du temps de maturation | 120 |
| 4.1.5 | Exemple de courbe de transparence pour la matrice synthétisée avec la condition 23 (contreplaqué)..... | 123 |
| 4.1.6 | Influence des cellules sur la transparence..... | 123 |
| 4.2 | Caractérisation par microscopie électronique à transmission..... | 124 |
| 4.2.1 | Matrices synthétisées avec la condition 1 | 125 |
| 4.2.2 | Observation de matrices opaques..... | 126 |
| 4.2.3 | Matrices synthétisées avec la condition 23 (organisation en contreplaqué) 127 | |
| 4.2.4 | Comparaison avec la membrane amniotique..... | 129 |
| 4.3 | Propriétés mécaniques..... | 130 |
| 4.3.1 | Matrices synthétisées avec la condition 1 | 130 |
| 4.3.2 | Matrices synthétisées avec la condition 23 | 131 |
| 4.4 | Conclusion..... | 133 |
| 5 | Aspects biologiques..... | 137 |
| 5.1 | Formation de l'épithélium | 137 |
| 5.1.1 | Rappel du dispositif expérimental..... | 137 |
| 5.1.2 | Culture des cellules épithéliales sur des matrices issues de la condition 1 et caractérisation..... | 137 |
| 5.1.3 | Formation de l'épithélium sur les matrices contreplaquée issues de la condition 23. | 142 |
| 5.1.4 | Observation MET des matrices avec cellules..... | 144 |
| 5.2 | Encapsulation des cellules stromales : Kératocytes | 145 |
| 5.2.1 | Les différents procédés d'encapsulation..... | 146 |

| | | |
|--|-------------------------------------|-----|
| 5.2.2 | Résultats | 148 |
| 5.3 | Cellules endothéliales | 153 |
| 5.3.1 | Cellules endothéliales HUVECS | 153 |
| 5.3.2 | Protocole expérimental | 153 |
| 5.3.3 | Résultats | 154 |
| 5.4 | Conclusion..... | 155 |
| 6 | Conclusion générale | 157 |
| Bibliographie | | 161 |
| Annexe 1 : Protocole d'extraction du collagène..... | | 173 |
| Annexe 2 : Les différents collagènes de la cornée..... | | 181 |
| Table des figures | | 183 |
| Liste des tableaux | | 193 |

Remerciements



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—



INSTITUT DE
LA VISION
PARIS



FONDATION
RECHERCHE
MÉDICALE

avec le soutien de la Fondation pour la Recherche Médicale

Glossaire (et définition) des acronymes

ABZ : Anterior Banded Zone

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATPase : classe d'enzymes liées au métabolisme énergétique qui hydrolysent les molécules d'adénosine-triphosphate (ATP)

CFE : Colony Forming Efficiency (efficacité de formation de colonies de cellules)

DAPI : Le DAPI ou 4',6-diamidino-2-phénylindole est une molécule fluorescente.

DFS : Dynamic Frequency Sweep (mesure en rhéologie dynamique à fréquence variable)

DMBA : 4 dimethylamino-benzaldehyde) est un immunosuppresseur

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium. C'est un milieu de base très utilisé pour supporter la croissance de cellules.

EDC : carbodiimide / produit de réticulation des collagènes

EGF : Epithelial Growth Factor

EGCM2 : milieu de culture cellulaire (Thermofischer Scientific[®]).

FACITs : Fibril Associated Collagen with Interrupted Triplehelix

FAP : Fluorogen Activating Peptide

FFOCT : Full-field optical coherence tomography (*FFOCT*), une variante de l'OCT

Ham F12 : milieu de nutrition contenant un fort niveau d'acides aminés, vitamines et quelques traces d'autres éléments (Ham[®]).

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique. L'HEPES est un composé organique zwitterionique.

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IKVAV : Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) peptide

KPro : kératoprosthetis

MEB : Microscope Electronique à Balayage (SEM en anglais)

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MMP : Les métalloprotéinases (MMPs) sont des enzymes protéolytiques sécrétées ou membranaires.

MPC : 2-méthacryloyloxyéthyl phosphorylcholine

NHDF : Normal Human Dermal Fibroblasts

NHS : produit de réticulation des collagènes / méthacrylate de N-hydrosuccinimydile ester

OCT : Optical Coherence Tomography (Tomographie par cohérence optique)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAA : poly(acide acrylique)

PBS : Phosphate-Buffered Saline. *Tampon* composé de phosphate de sodium (Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4) et de sel (NaCl)

PCR : Polymerase Chain Reaction (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase) est une technique de répllication ciblée *in vitro*.

PEG : polyéthylène glycol

PFA : paraformaldéhyde

PHEA : poly(2-hydroxyéthyl) acrylate. Il forme un hydrogel dans l'eau.

pHEMA : poly(2-hydroxyethyl méthacrylate). Il forme un hydrogel dans l'eau.

PMMA : poly(méthyl méthacrylate) en français poly(méthacrylate de méthyle) est un polymère thermoplastique transparent.

PNBZ : Posterior Non-Banded Zone

PNiPAAm : poly(N-isopropylacrylamide)

PVA : Polyacétate de vinyle

RGD : (Arg-Gly-Asp) Peptide

rpm : round per minute (tour.min⁻¹)

RPMI : milieu de culture cellulaire (Thermofischer Scientific®).

SDS : Sodium DodecylSulfate, en français dodécylsulfate de sodium. C'est un détergent couramment utilisé en biochimie et biologie moléculaire.

SEM-FEG : Scanning Electron Microscope - Field Emission Gun (microscope électronique à balayage avec canon à effet de champ).

SGR : Soft Glassy Rheology

SHG : Second Harmonic Generation (Génération de seconde harmonique)

TEM : Transmission Electron Microscope (Microscope Electronique à Transmission)

TEMED : Tétraméthyléthylènediamine. Il est utilisé avec du persulfate d'ammonium pour catalyser la polymérisation de l'acrylamide utilisé dans les gels d'électrophorèse.

TGFβ : Transforming Growth Factor

TERP : poly(N-isopropylacrylamide-coacrylic acid-coacryloxysuccinimide), PNiPAAm-coAAc-coASI, dénommé TERP

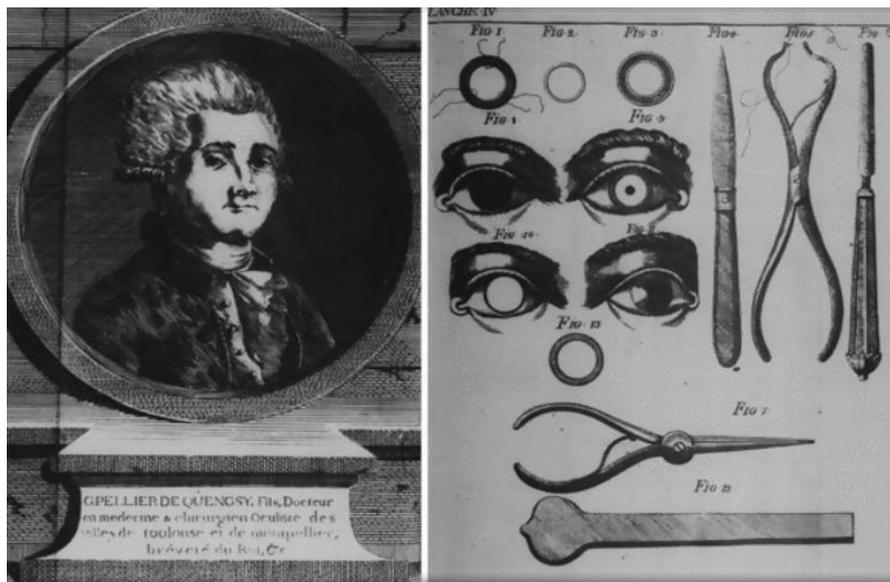
VEGF : Vascular endothelial growth factor (VEGF)

YIGSR : laminin-derived peptide YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg)

2PEF : fluorescence excitée à 2 photons

Introduction générale

La cécité d'origine cornéenne, qui touche environ 10 millions de personnes dans le monde, nécessite, lorsque cela est la seule solution applicable, une greffe de cornée (aussi appelée Kératoplastie). Les pathologies les plus courantes entraînant une baisse d'acuité visuelle et nécessitant une greffe de cornée sont le Kératocône, l'œdème de cornée ainsi qu'une cicatrice post-traumatique ou d'origine infectieuse. La greffe peut consister à remplacer la cornée dans toute son épaisseur ou seulement en partie. Dans ce dernier cas on parle de greffe lamellaire. En France, il y a environ 4000 greffes de cornée chaque année. Cependant, le faible nombre de donneurs et les nombreux rejets ont rendu nécessaire le développement de cornées artificielles (Chuo *et al.*, 2011 ; Gomaa *et al.*, 2010 ; Ruberti *et al.*, 2011). La première tentative connue de remplacement de la cornée remonte à l'année 1789. Guillaume Pellier de Quengzy (*Précis ou cours d'opération sur les yeux*, Paris 1789) tenta de remplacer une cornée opaque par un verre placé dans un anneau d'argent et fixé à la sclère grâce à des fils de coton.



Précis ou cours d'opération sur les yeux, Paris 1789. Planche représentant la cornée artificielle développée par Guillaume Pellier de Quengzy.

Plusieurs cornées artificielles à base de polymères synthétiques ont déjà été utilisées comme la Boston KPro (Dohlman *et al.*, 2006) , la AlphaCor™ KPro (Myung *et al.*, 2009) ou encore celle développée par Griffith *et al.* (Griffith *et al.*, 1999). Cependant aucune des cornées artificielles développées ne répond pleinement à toutes les exigences auxquelles devrait répondre une cornée artificielle « idéale ». Une cornée artificielle doit s'intégrer pleinement dans le tissu environnant, permettre la reconstruction du stroma, la formation d'un épithélium cornéen et la régénération nerveuse.

Ainsi, cette thèse a pour but de développer une cornée artificielle mimant les caractéristiques principales de la cornée et pouvant servir comme support à une régénération naturelle d'une cornée *in vivo*. La cornée est majoritairement composée de collagène de type I et les fibrilles de collagène I qui y sont organisées en contreplaqué. C'est donc logiquement que nous avons décidé de l'utiliser afin de créer une cornée artificielle. L'originalité du projet est de tirer parti des propriétés cristalline-liquides et d'auto-assemblage du collagène pour générer un matériau adéquat. En effet, les molécules de collagène, sous certaines conditions, forment des phases cristal-liquides. Ainsi, en trouvant les conditions qui permettent d'obtenir une phase cristal-liquide qui se rapproche de l'organisation en contreplaqué de la cornée et en stabilisant cette phase par fibrillogenèse, on peut créer une matrice transparente, solide et organisée de collagène fibrillé.

Le premier chapitre de cette thèse présente les différents éléments du projet : le collagène et particulièrement le collagène de type I, les phases cristal-liquides (quelques généralités), la cornée ainsi qu'un état de l'art sur les cornées artificielles.

Le second chapitre présente les différentes conditions physico-chimiques utilisées ainsi que les techniques de caractérisation des phases cristal-liquides (microscopie à lumière polarisée et génération de seconde harmonique, caractérisation mécanique) et des matrices.

Le chapitre 3 illustre les résultats obtenus sur les phases cristal-liquides du collagène. Les conditions utilisées dans ce chapitre ont été sélectionnées auparavant car elles permettent de fabriquer des matrices très transparentes. Nous verrons dans ce chapitre qu'il est possible de former une phase cristal-liquide en contreplaqué et qu'un solide organisé peut être créé à partir de cette phase.

Le chapitre 4 décrit toutes les conditions physico-chimiques testées. Nous caractériserons la microstructure des matrices obtenues selon différentes conditions en utilisant les outils présentés précédemment. Nous déterminerons la transparence ainsi que les propriétés mécaniques des matrices les plus adaptées à la problématique. Nous verrons également l'influence de divers paramètres sur la transparence des matrices.

Le chapitre 5 concerne les différentes expériences de culture cellulaire réalisées sur les matrices : du développement d'un épithélium cornéen à l'inclusion de cellules souches stromales dans les matrices.

Nous concluons par une synthèse exhaustive de ce projet et par des perspectives envisageables à ces études.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION ETAT DE L'ART

1 Introduction - Etat de l'art

1.1 La famille des collagènes

Le collagène, molécule de la matrice extracellulaire, comporte de grands domaines organisés en triple hélice. Il existe 28 types de collagènes dont les différences se situent dans la composition des chaînes polypeptidiques, dans leur structure tridimensionnelle et dans leur répartition dans les tissus conjonctifs (Prockop *et al.*, 1995). Dans la plupart des collagènes, les trois chaînes polypeptidiques qui forment une hélice α sont identiques. Si les chaînes sont différentes, les collagènes sont dits hétéro-trimères.

Les 28 types de collagènes sont répartis en sept familles qui regroupent des collagènes aux comportements structuraux semblables (*cf.* Figure 1-1).

Il y a par exemple les collagènes fibrillaires, ceux qui sont assemblés en réseaux mais qui ne font pas de fibrilles ou encore ceux se trouvant à la surface des fibrilles (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triplehelix FACITs). Les collagènes FACITs sont des collagènes relativement petits qui présentent des interruptions dans le domaine en triple hélice. Un exemple de ce type de collagènes est le collagène IX qui se lie de façon covalente au collagène II (Wu *et al.*, 1992). Le collagène IV est un exemple de collagène formant un réseau. Dans les tissus, il forme un réseau entrelacé avec les membranes basales où il a un rôle biologique important. Le réseau est formé par l'interaction entre les deux domaines non collagéniques terminaux. L'hexamère formé est stabilisé par des liaisons covalentes entre une Méthionine et une Lysine (Than *et al.*, 2002).

Certains collagènes sont spécifiques d'un type tissulaire et d'autres sont plus ubiquitaires. Le collagène le plus abondant est le collagène fibrillaire de type I et c'est celui qui va nous intéresser par la suite.

| Type | Isoforme | Famille | Distribution tissulaire | Caractéristiques |
|---------|--|---------|---|--|
| I. | $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ | A | Os, derme, cornée... | Majoritaire |
| | $[\alpha_1(I)]_3$ | A | Derme, dentine | Mineur |
| II. | $[\alpha_1(II)]_3$ | A | Cartilage, humeur vitreuse | Fibrilles fines |
| III. | $[\alpha_1(III)]_3$ | A | Derme, paroi des vaisseaux | Associé au type I |
| IV. | $[\alpha_1(IV)]_2\alpha_{1-6}(IV)$ | B | Membranes basales | Non fibrillaire |
| V. | $\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$ | A | Tissus conjonctifs | Régule la taille des fibrilles de type I |
| VI. | $\alpha_1(VI)\alpha_2(VI)\alpha_3(VI)$ | D | Muscle, poumon, cartilage, derme, paroi des vaisseaux | Filaments perlés |
| VII. | $[\alpha_1(VII)]_3$ | E | Peau, jonction dermo-épidermique, muqueuse | Fibrilles d'ancrage |
| VIII. | $[\alpha_1(VIII)]_2\alpha_2(VIII)$ | B | Endothélium, membrane de Descemet | Non fibrillaire |
| IX. | $\alpha_1(IX)\alpha_2(IX)\alpha_3(IX)$ | C | Cartilage, corps vitré | Associé au type II |
| X. | $[\alpha_1(X)]_3$ | B | Cartilage hypertrophique | Non fibrillaire |
| XI. | $\alpha_1(XI)\alpha_2(XI)\alpha_3(XI)$ | A | Cartilage, corps vitré | Associé au type II |
| XII. | $[\alpha_1(XII)]_3$ | C | Ligaments, tendons | Associé au type I |
| XIII. | $[\alpha_1(XIII)]_3$ | F | Follicules pileux, épiderme jonction neuromusculaire | Transmembranaire |
| XIV. | $[\alpha_1(XIV)]_3$ | C | Derme, tendons, poumon, foie, paroi des vaisseaux | Associé au type I |
| XV. | $[\alpha_1(XV)]_3$ | G | Muscle, pancréas, rein, fibroblaste, vaisseaux | |
| XVI. | $[\alpha_1(XVI)]_3$ | C | Fibroblaste, kératinocyte | Associé au type I |
| XVII. | $[\alpha_1(XVII)]_3$ | F | Jonction dermo-épidermique | |
| XVIII. | $[\alpha_1(XVIII)]_3$ | G | Poumon, foie, rate | Associé au type IV |
| XIX. | $[\alpha_1(XIX)]_3$ | C | Rhabdomyosarcome | Rare |
| XX. | $[\alpha_1(XX)]_3$ | C | Tendon, épithélium cornéen, peau embryonnaire | |
| XXI. | $[\alpha_1(XXI)]_3$ | C | Paroi des vaisseaux | |
| XXII. | $[\alpha_1(XXII)]_3$ | C | Cartilage, follicules pileux | |
| XXIII. | $[\alpha_1(XXIII)]_3$ | F | Jonctions des tissus | Rare |
| XXIV. | $[\alpha_1(XXIV)]_3$ | A | Cornée, os | Expression sélective |
| XXV. | $[\alpha_1(XXV)]_3$ | F | Plaque amyloïde (CLAC) | Associé au type I |
| XXVI. | $[\alpha_1(XXVI)]_3$ | D | | |
| XXVII. | $[\alpha_1(XXVII)]_3$ | A | Cartilage, peau | Associé au type I |
| XXVIII. | $[\alpha_1(XXVIII)]_3$ | D | Membrane basale | Nombreuses interruptions |

Figure 1-1 : Les différents types de collagène et leur distribution dans différents tissus (tiré de S. Bancelin, 2013 selon Kadler *et al.*, 2007 et Prockop *et al.*, 1995).

1.1.1 Le collagène I

1.1.1.1 La molécule de collagène de type I

Le collagène de type I est un collagène fibrillaire. Il est le constituant majoritaire des tissus conjonctifs tels que les os, la peau, les tendons, la cornée ainsi que la paroi des vaisseaux sanguins. Deux brins α_1 ont une séquence identique de 1056 acides aminés alors que le troisième brin α_2 a une séquence de 1023 acides aminés. Ces trois brins sont formés dans leur partie centrale par la répétition d'une séquence de trois acides aminés Glycine-X-Y. La glycine pointe vers le centre de la triple hélice alors que les résidus

d'acides aminés X et Y, plus grands, pointent vers l'extérieur de la triple hélice, comme le montre la Figure 1-2, et sont donc disponibles pour des interactions avec d'autres molécules ou avec le solvant. La proline et l'hydroxyproline sont les plus régulièrement rencontrés (30 % des cas) en position X et Y respectivement. On peut également remarquer la présence d'agglomérats de résidus polaires tous les 234 acides aminés ce qui correspond à une distance de 67 nm dont on verra l'importance lors de l'auto-assemblage des molécules de collagène en fibrilles. La séquence d'acides aminés correspond à la structure primaire et c'est le repliement de la chaîne en hélice gauche dont le pas vaut 8,68 nm, qui forme la structure secondaire. Le repliement est entraîné par les répulsions stériques entre les résidus de proline qui se trouvent en position X et ceux d'hydroxyproline qui sont en position Y. Entre deux résidus, la distance axiale est de 0,286 nm. Ensuite, la structure tertiaire est formée par le repliement des structures secondaires dans l'espace et la structure quaternaire par l'association de monomères (les chaînes α) entre eux. En effet, la présence de nombreuses glycines le long des chaînes α leur permet de s'associer pour former une triple hélice droite. La triple hélice a alors une longueur de 300 nm et un diamètre d'environ 1.5 nm. Des liaisons hydrogènes entre la glycine d'une chaîne et les groupements carboxyles d'une autre chaîne assurent la stabilité de la triple hélice. Long *et al.* et Bella *et al.*, 1996) ont d'ailleurs noté que le remplacement d'une glycine par un autre résidu empêche la formation des triples hélices (Long *et al.*, 1993; Bella *et al.*, 1996) ce qui peut conduire à certaines pathologies (Mottes *et al.*, 1998; Wenstrup *et al.*, 2006; Olague-Marchan *et al.*, 2000). Les extrémités de la molécule de collagène I, appelées télépeptides, sont des régions non-hélicoïdales.

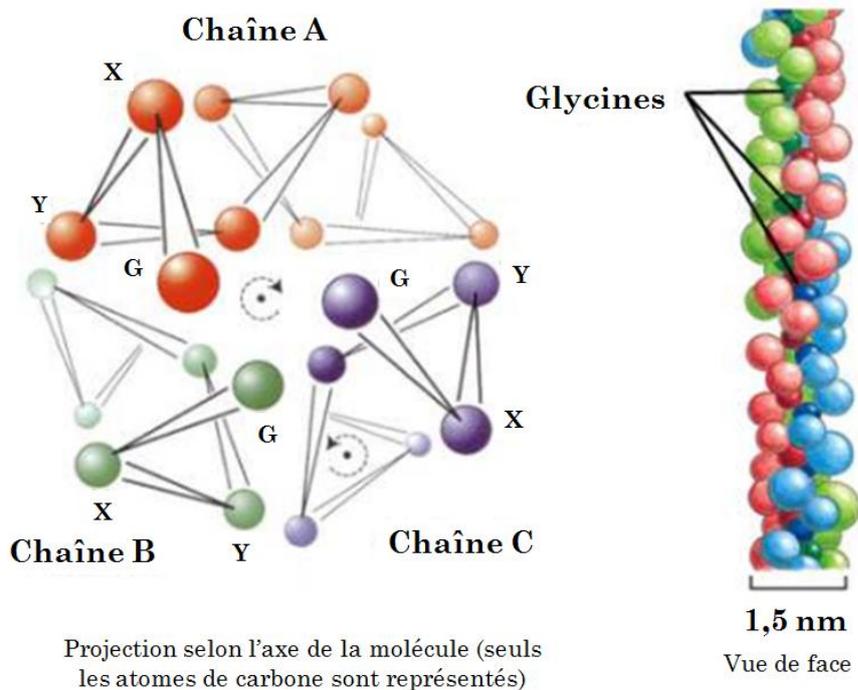


Figure 1-2 : La structure du collagène type I en triple hélice, avec la répétition du motif Gly-X-Y (adapté de Hulmes, 2008).

De la molécule de procollagène au collagène

In vivo, le collagène I est synthétisé par les cellules. La synthèse démarre par celle des chaînes α au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux dans lequel ont lieu des modifications post traductionnelles. L'hydroxylation de certains résidus de proline et de lysine, la glycolysation de certaines hydroxylysines et la formation de ponts disulfures entre les propeptides C-terminaux (qui provoque l'enroulement des trois chaînes dans la direction N-terminale) donnent une molécule appelée procollagène. Le procollagène est soluble en condition physiologique grâce aux propeptides non hélicoïdaux et chargés. A ce niveau, les molécules de procollagène se trouvent dans des vésicules dans l'appareil de Golgi avant d'être secrétées en dehors de la cellule.

A la fin du processus, un clivage enzymatique des propeptides N et C terminaux, domaines globulaires de la molécule a lieu, entraînant la formation des fibrilles. Ce processus est illustré sur la Figure 1-3.

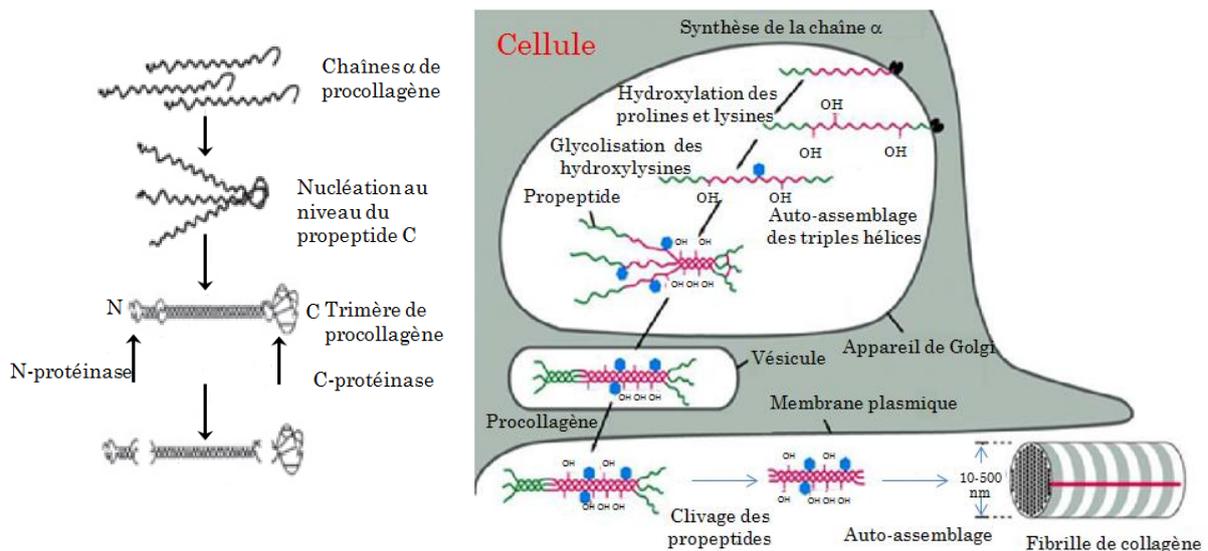


Figure 1-3 : Synthèse du collagène type I. Le clivage des propeptides a lieu en dehors de la cellule. Cela entraîne la perte de la solubilité en milieu physiologique des triples hélices et leur auto-assemblage en fibrille (d'après P. Fratzl, 2008 à gauche et d'après *The Art of MBOC³ : The Complete Set of Figures from Molecular Biology of the Cell*, Alberts *et al.*, 1996 à droite)

1.1.2 Des fibrilles aux structures hiérarchiques

La perte des domaines globulaires entraîne une forte baisse de la solubilité en conditions physiologiques. Le clivage des extrémités expose les séquences télépeptidiques qui sont de petits domaines non hélicoïdaux. Ces télépeptides contiennent les sites de liaison pour la fibrillogenèse (Prockop & Fertala, 1998). Les fibrilles de collagène sont formées spontanément par les triples hélices de collagène, solubles à pH acide, mais non solubles en milieu physiologique lors de la fibrillogenèse. *In vivo* les fibrilles sont souvent formées

par différents types de collagènes et sont alors appelées hétérotypiques. Dans l'os par exemple, on trouve des fibrilles formées par du collagène I et du collagène V. Autre exemple, la peau est constituée de molécules de type I, III et V.

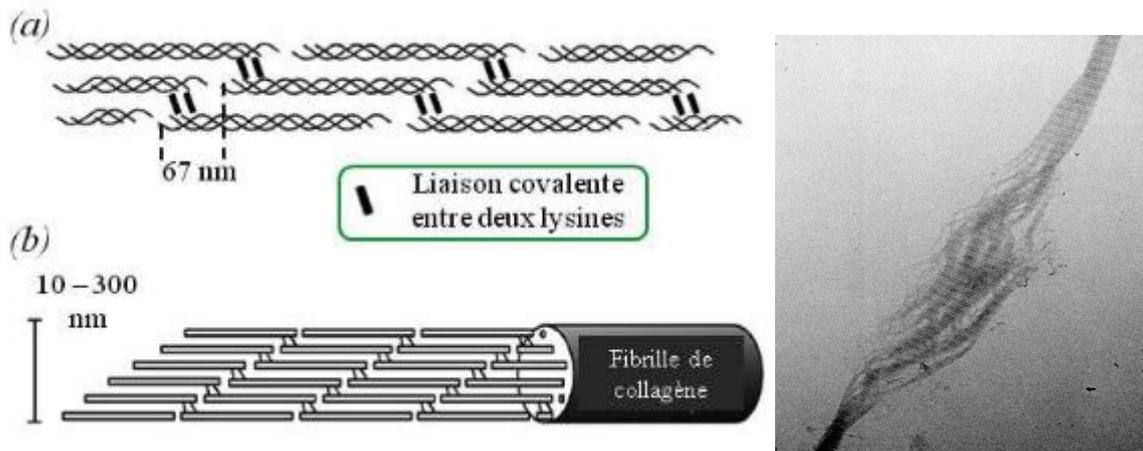


Figure 1-4 : (a) Représentation schématique d'une fibrille. Le diamètre varie selon les tissus. Des liaisons covalentes stabilisent les fibrilles. (d'après B. Leblanc) (b) Image MET d'une fibrille (photo MET, G. Mosser).

Les fibrilles sont stabilisées par des interactions polaires, hydrophobes et par des réticulations covalentes entre deux lysines (Figure 1-4). Dans les fibrilles de collagène, les molécules sont alignées suivant l'axe longitudinal mais présentent un décalage axial. On observe ainsi en microscopie électronique à transmission une striation périodique de 67 nm marquée par une alternance de zones sombres et claires (Figure 1-5). Cette période, appelée D, correspond à la distribution répétitive de résidus polaires tous les 234 acides aminés dans la séquence du tropocollagène. En réalité, suivant les tissus et l'hydratation des fibrilles, cette valeur peut varier entre 64 et 68 nm.

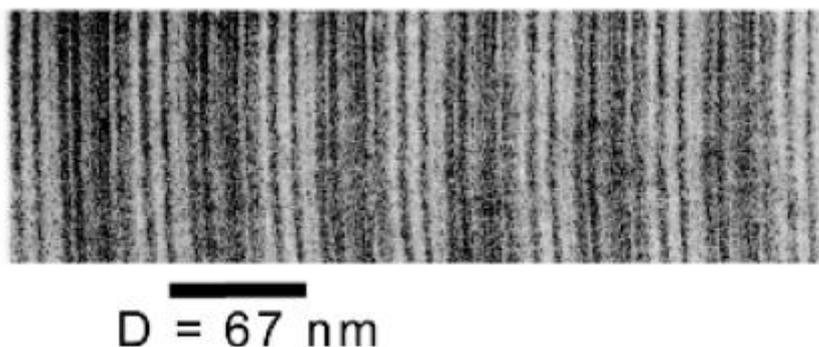


Figure 1-5 : Fibrille observée au TEM (Kadler *et al.*, 1996) avec la striation caractéristique de 67 nm.

Le modèle théorique permettant le mieux d'expliquer cette répétition est le modèle de Hodge et Petruska qui date de 1963 (Hodge & Petruska, 1963). L'espace vide entre deux molécules alignées, nommé *gap*, mesure 47 nm et est moins dense que la zone de

recouvrement, appelée *overlap*, qui mesure 20 nm. Cet espace « vide » est lié au fait qu'une triple hélice a une taille égale à $4,47D$, donc une valeur non entière de la période D . La longueur et le diamètre des fibrilles varient selon les tissus entre 12 nm et plus de 500 nm de diamètre. Elles organisent les différents tissus conjonctifs dans lesquels elles sont synthétisées, et ce de façons différentes. En effet il y a des organisations caractéristiques de chacun des tissus, ce qui illustre le rôle structural du collagène de type I.

Organisation hiérarchique

Dans les différents tissus, comme ceux présentés dans la Figure 1-6, l'organisation des fibrilles est différente :

- dans la cornée (expliqué en détail plus loin) les fibrilles, dont le diamètre est compris entre 20 et 35 nm, sont organisées en lamelles. Dans une lamelle, elles sont alignées parallèlement et il y a une différence d'environ 90° dans la direction des fibrilles entre deux lamelles voisines. C'est une organisation dite en contreplaqué.
- dans le derme, le diamètre des fibrilles varie beaucoup et elles s'associent en faisceaux. L'ensemble donne une sorte de "plat de spaghettis".
- dans les tendons (Figure 1-6), les fibrilles sont assemblées en fibres parallèles entre elles (faisceaux) et s'organisent en forme de vague d'où la bonne résistance à l'étirement des tendons. Cette organisation en ondulation décrite par Diamant *et al.* (Diamant *et al.*, 1972) est également retrouvée dans les ligaments (Shah *et al.*, 1979) ou dans le disque intervertébral (Cassidy *et al.*, 1989). Lorsqu'un tendon est observé en lumière polarisée, on observe une alternance de bandes sombres et claires rappelant une organisation cristal-liquide en bandes (Giraud-Guille & Besseau, 1998; Dlugosz *et al.*, 1978).
- dans les ostéons de l'os, les fibrilles sont organisées en faisceaux s'agencant de manière hélicoïdale avec des angles de discrétisation plus ou moins grands.

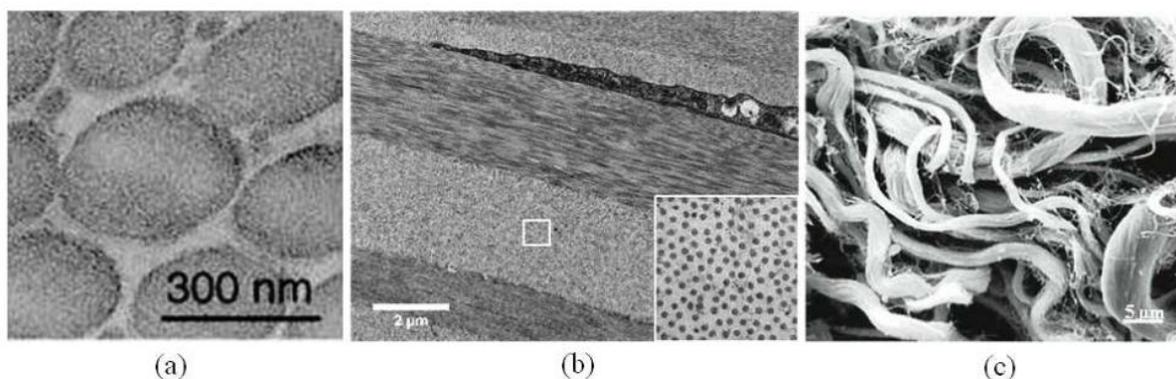


Figure 1-6 : Organisation des fibrilles de collagène dans différents tissus. (a) image au MET de tendons, les fibrilles sont assemblées en fibres dans lesquelles les fibrilles sont parallèles entre elles (D'après Komai *et al.*, 1991); (b) organisation en contreplaqué dans la cornée (d'après Salvotelli); (c) image MEB du derme (Ushiki *et al.*, 2002) (Tiré de Bancelin, 2013)

1.1.3 La fibrillogenèse *in vitro*

Nous avons vu précédemment que les molécules de collagène ne sont pas solubles dans les conditions physiologiques (à pH=7,4) et qu'ainsi se forment les fibrilles. Cependant les molécules de collagène de tissus jeunes sont solubles à pH acide à température ambiante. Ainsi, les molécules de solutions acides de collagène peuvent être fibrillées soit, si elles sont en condition physiologique à 4°C, en augmentant la température à 37°C, soit en procédant à une augmentation du pH si elles sont en solutions acides.

Dans le cas de la fibrillogenèse induite par une augmentation de pH, cette dernière peut se faire en soumettant la solution de collagène à des vapeurs d'ammoniaque. Ceci induit la précipitation des molécules de collagène qui vont s'assembler en fibrilles sans dilution de la solution. Selon les conditions physico-chimiques (pH, force ionique), la taille des fibrilles va varier ce qui aura des conséquences notamment sur les propriétés mécaniques et la transparence des matrices obtenues. En outre, on le verra dans le chapitre 4, en fonction des conditions physico-chimiques, la phase cristal-liquide obtenue en solution concentrée va également changer. Engendrer la fibrillogenèse de solutions organisées avec cette méthode d'élévation de pH sous vapeur d'ammoniaque permet de conserver l'organisation (Besseau & Giraud-Guille, 1995) et donc de créer des matrices organisées.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la précipitation des molécules de collagène peut aussi être induite thermiquement. Gross et Kirk (Gross & Kirk, 1958) ainsi que Jackson et Fessler (Jackson & Fessler, 1955) ont été les premiers à étudier ce phénomène et ont montré que du collagène dans une solution saline neutre à 4°C formait un gel fibrillaire lorsque la température était remontée à 37°C pour des concentrations de départ assez faibles comprises entre 0,2 et 2 mg/mL. Ils ont constaté cependant que le collagène pouvait se dénaturer avant d'arriver à 37 °C et que la précipitation présentait des inhomogénéités. Nous verrons dans le chapitre 5 qu'une solution acide concentrée (30-90 mg/mL) de collagène mise au contact de milieu de culture (DMEM, pH=7,4) fibrillait même sans être placée à 37°C. Le fait de la placer à froid ralentit seulement le processus, le collagène n'étant pas soluble à pH neutre aux concentrations avec lesquelles nous avons travaillé.

1.1.4 Les phases cristal-liquides et le collagène

1.1.4.1 Introduction

Les premières observations de cristaux liquides ont eu lieu en 1854 avec la découverte de la myéline. Il s'agit d'un composé fluide et coloré entourant les fibres nerveuses. C'est en 1857 qu'est mise en évidence la double réfraction de la myéline qui lui donne son aspect coloré.

La véritable découverte des cristaux liquides est attribuée à Reinitzer (Reinitzer, 1888) dont les recherches portaient sur les rôles dans les espèces végétales des espèces dérivées du cholestérol. En 1888, il remarqua que des cristaux de benzoate de cholestérol ne se comportaient pas comme des cristaux "classiques" lorsqu'ils étaient chauffés. En effet, le benzoate de cholestérol fondait à 145,5 °C pour former un fluide laiteux. En augmentant encore la température, ce fluide se clarifiait parfaitement à 178,5 °C. Reinitzer proposa l'hypothèse d'une fusion en deux étapes ce qui constitua une première avancée dans la reconnaissance d'un autre état de la matière thermodynamiquement stable. Ensuite vint Friedel qui publia en 1922 un ouvrage intitulé "Les états mésomorphes de la matière" (Friedel, 1922). Il a utilisé le mot mésophase pour désigner l'état de la matière se trouvant à cheval entre le liquide et le cristal. Le mésogène désigne alors la molécule capable de former une mésophase.

Une mésophase ne peut se former qu'à partir d'une molécule anisotrope. Généralement, la molécule mésogène est de forme allongée avec une région centrale assez rigide et des extrémités plus flexibles.

Il existe deux grandes familles de cristaux liquides : les cristaux liquides *thermotropes* et les *lyotropes*.

Les cristaux liquides thermotropes.

Dans le cas des cristaux liquides thermotropes, le paramètre régissant leur organisation en phase organisée est la température. Au delà d'une température critique, la phase est désorganisée et dite isotrope. Les phases cristal-liquides thermotropes sont essentiellement formées par des molécules dites calamitiques ou discoïdes. Les molécules calamitiques possèdent un cœur aromatique très rigide sur lequel viennent se greffer une ou plusieurs chaînes alkyles. Généralement, les phases nématiques sont plutôt stables avec des molécules dont les chaînes alkyles sont courtes alors que les phases smectiques (voir ci-dessous) sont obtenues pour des molécules à grandes chaînes alkyles. Les groupes liant les résidus aromatiques doivent maintenir la linéarité de la molécule. La présence de groupements tels que les cyanures favorise la formation de phases cristal-liquides du fait des interactions polaires attractives entre les paires de molécules. En outre, la présence de groupements latéraux fluorés augmente la polarisabilité de la molécule.

Les cristaux liquides lyotropes.

La concentration de l'espèce mésogène est le paramètre déterminant et, dans ce cas, l'organisation en mésophase se fait sous l'influence du solvant. Un exemple de cristal liquide lyotrope est le savon. Le collagène, dont nous utilisons les propriétés cristal-liquides pour former des matrices denses organisées, est un mésogène lyotrope, c'est-à-dire qu'il forme des mésophases à partir d'une certaine concentration dans son solvant.

1.1.4.2 Les différents types de phase

Dans une phase cristal-liquide, les molécules sont libres de se déplacer, il n'y a pas d'ordre positionnel, mais elles conservent tout de même une orientation privilégiée. L'ordre orientationnel n'est pas aussi important que dans les cristaux, mais les molécules des mésophases restent orientées majoritairement dans une direction. Comme les molécules ne sont pas fixes, il est nécessaire d'introduire la notion de moyenne dans l'ordre orientationnel. La direction moyenne c'est-à-dire la direction privilégiée, est représentée par un vecteur directeur \vec{n} . Afin de caractériser l'alignement moyen des molécules de la mésophase suivant le vecteur directeur, le paramètre d'ordre $S(\theta)$ est défini selon :

$$S(\theta) = \frac{1}{2} \langle \cos^2(\theta) - 1 \rangle \quad \text{Équation 1-1}$$

S vaut 1 pour un solide cristallin ou pour une phase dans laquelle toutes les molécules sont alignées exactement dans la même direction et 0 pour un liquide isotrope.

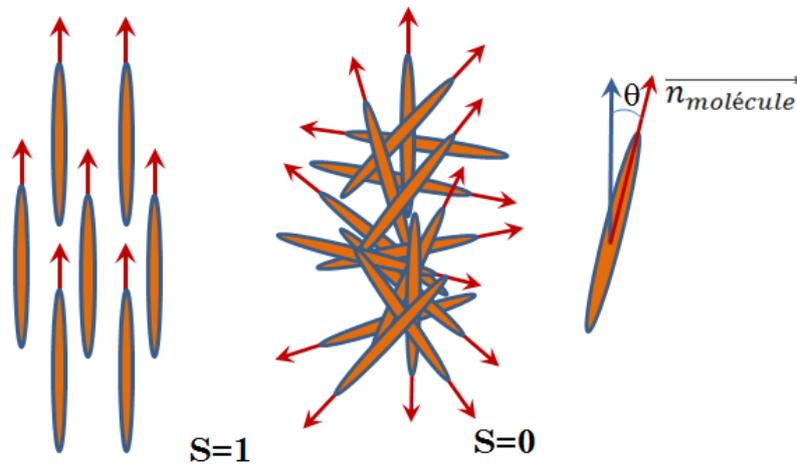


Figure 1-7 : S vaut 1 lorsque toutes les molécules sont alignées et 0 pour un liquide

La phase nématique

C'est la phase cristal-liquide qui présente un seul ordre d'orientation. La symétrie de rotation est totale autour du vecteur directeur \vec{n} . De fait les états \vec{n} et $-\vec{n}$ sont équivalents. Il n'existe pas d'ordre particulier dans la position des molécules.

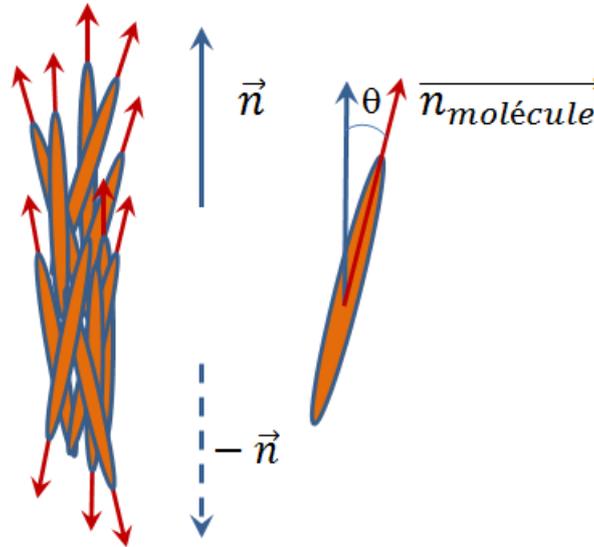


Figure 1-8 : phase nématique. Globalement les molécules sont orientées selon une direction moyenne donnée par le vecteur directeur.

Les phases smectiques

Les phases smectiques combinent un ordre d'orientation et un ordre de position des centres de gravité des molécules à la fois dans le plan des couches et dans la direction perpendiculaire. Les molécules sont alignées parallèlement au sein de couches dans lesquelles elles peuvent se déplacer. Il existe de nombreuses phases smectiques. Dans les phases smectiques de type A et B les molécules sont perpendiculaires aux couches. La phase smectique B présente une particularité supplémentaire : les molécules forment un réseau hexagonal.

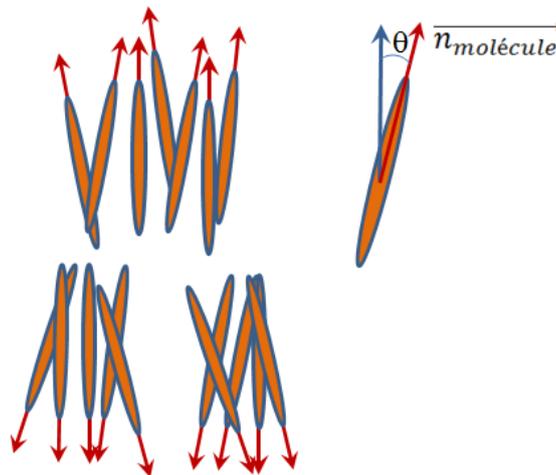


Figure 1-9 : Représentation d'une phase smectique A. Les molécules sont organisées en couches. Au sein d'une couche, elles sont orientées plus ou moins dans une même direction.

Dans les smectiques C, les molécules sont obliques par rapport au plan des couches et cette obliquité peut, ou non, varier d'une couche à l'autre. Notamment, elle peut varier

continûment en formant une structure hélicoïdale C^* . Ce cas particulier est appelé phase smectique chirale.

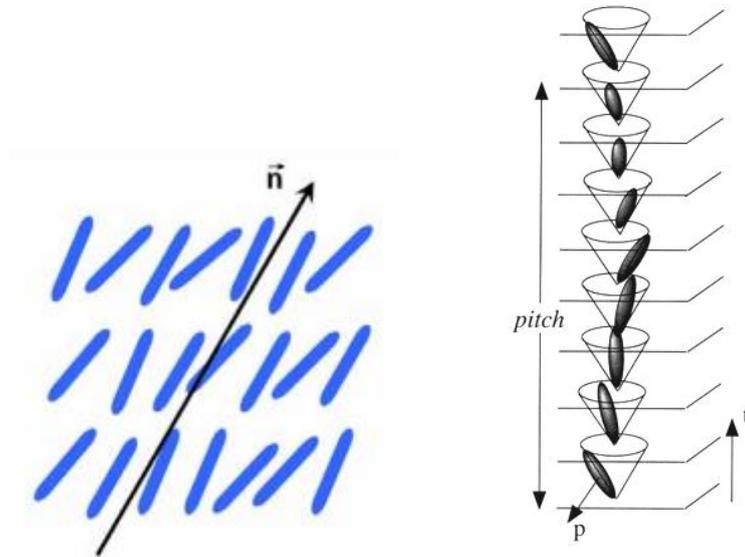


Figure 1-10 : Représentation schématique d'une phase smectique C (à gauche) et d'une smectique C^* (à droite). Dans cette dernière les molécules sont inclinées par rapport à la perpendiculaire aux couches. Il y a une torsion hélicoïdale d'une couche à l'autre. (Tiré de Fernandes, 2008)

La phase cholestérique ou nématique chirale

Dans la phase cholestérique, les molécules sont organisées de façon hélicoïdale c'est à dire que le vecteur directeur tourne de façon continue autour d'un axe dit cholestérique pour former une hélice. La distance séparant deux couches de molécules alignées dans la même direction correspond au pas.

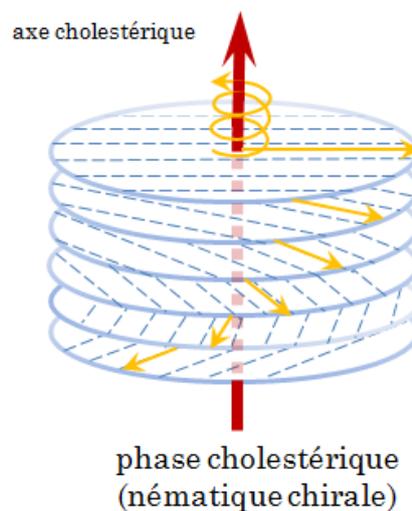


Figure 1-11 : Phase cholestérique. Le vecteur directeur décrit une hélice. Les molécules tournent de façon continue. Sur la figure, l'orientation des molécules varie d'un plan à l'autre avec un angle constant.

Il existe de nombreux analogues biologiques de cristaux liquides cholestériques. En effet, l'organisation dans certains tissus du vivant rappelle celle des molécules dans une phase cholestérique. Bouligand a fait l'analogie entre cette phase et l'organisation observée de la matrice organique de la carapace de crabe (Bouligand, 1965). Il a observé sur des coupes histologiques que le réseau de chitine (mis en évidence après déminéralisation de la carapace) formait des séries d'arceaux s'emboîtant en strates parallèles. Ceci découle des coupes faites sur une structure organisée d'une façon similaire à une phase cholestérique. Dans un seul plan (une coupe), les fibres de chitine sont toutes parallèles entre elles mais en changeant de plan, elles tournent toutes d'un petit angle constant. Il est important de noter qu'il s'agit d'une organisation stabilisée, sans mouvement. Cette organisation se retrouve également avec la cellulose dans de nombreuses parois végétales (Neville *et al.*, 1976) ou avec le collagène dans l'os compact (Giraud-Guille, 1988).

La phase nématique contreplaquée

Dans cette thèse, il sera souvent question d'une phase cristal-liquide contreplaquée (Figure 1-12). Cette phase consiste en différentes couches de molécules, alignées au sein d'une même couche, mais il y a un angle de 90° entre les molécules dans deux couches successives et on passe brutalement d'une couche à une autre. Cette phase ne semble pas continue mais discrète, à la différence de la phase cholestérique. Le pas de cette organisation est la distance séparant deux couches de molécules parallèles et orientées dans la même direction.

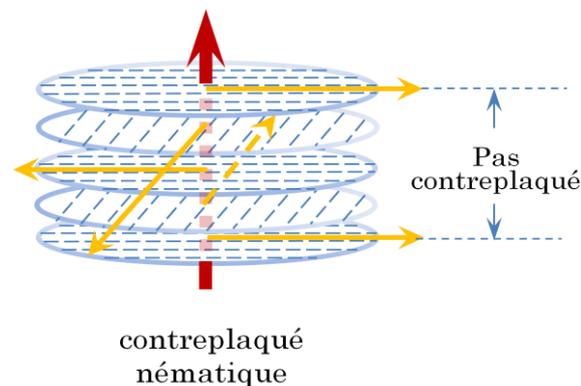


Figure 1-12 Représentation schématique d'une organisation cristal-liquide contreplaquée. Au sein d'une même couche les molécules sont alignées. On passe brutalement d'une couche à l'autre. Les molécules d'une couche font un angle de 90° avec les molécules de la couche suivante.

Les phases discotiques

Ces phases sont obtenues avec des molécules en forme de disque, celles-ci s'empilent en colonnes conduisant à un réseau hexagonal ou rectangulaire. Les molécules qui forment ce type de phase sont souvent composées de noyaux polyaromatiques. Les distances entre les molécules d'une même colonne peuvent varier (Figure 1-13).



Figure 1-13 : Phase discotique (d'après Kouwer *et al.*, 2003) formée par des molécules planes. Les colonnes forment ici un réseau hexagonal.

1.1.4.3 Les molécules biologiques mésogènes

Différentes molécules biologiques sont capables de former des phases cristal-liquides. Les suspensions d'ADN peuvent conduire à des phases cholestériques notamment, comme l'a démontré Robinson dès 1961 (Robinson, 1961). Plus tard en 1968, Bouligand a montré que l'ADN adoptait une organisation cholestérique *in vivo* au sein de chromosomes de Dinoflagellés (Bouligand, 1968). Ces phases ont été par la suite largement étudiées par Livolant *et al.* (Livolant *et al.*, 1987).

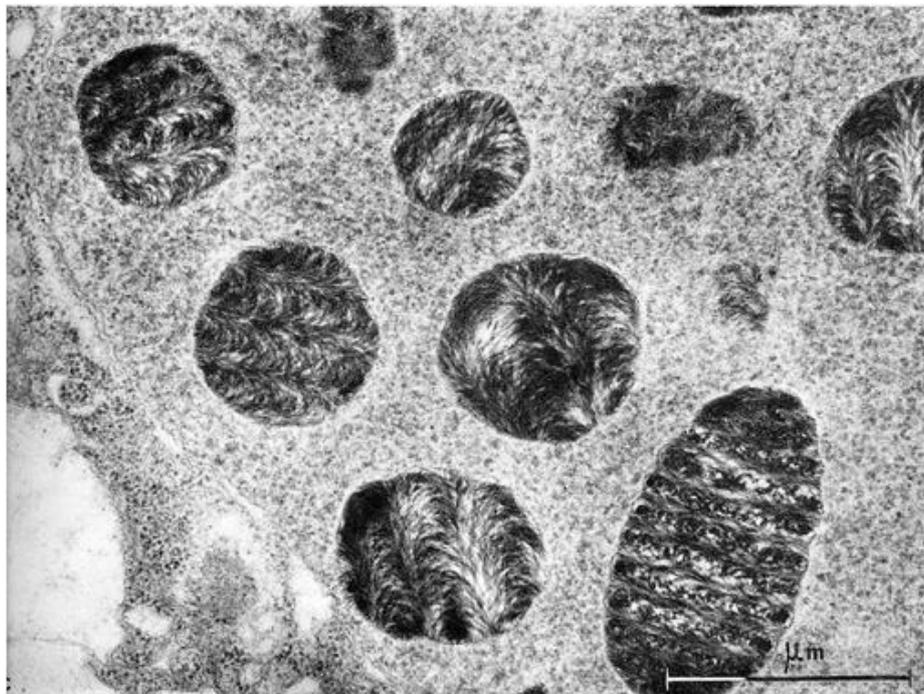


Figure 1-14 Organisation cholestérique dans les chromosomes de dinoflagellés. En coupe oblique, on remarque la présence caractéristique des arceaux. (Livolant *et al.*, 1987)

Cette organisation a également été retrouvée dans la cuticule des arthropodes (Chitine) (Bouligand, 1965; Livolant, 1978) et dans la paroi végétale (cellulose) (Roland & Vian,

1979). Comme mentionné précédemment, cela montre que l'organisation dans certains tissus biologiques est analogue à celle d'une phase cristal-liquide stabilisée. Dès 1978 une structure dite en contreplaqué torsadé est mise en évidence dans les écailles d'un poisson appelé coelacanthe. Les fibres tournent d'un plan à l'autre avec un angle à peu près constant. La rotation des couches de fibrilles peut être observée sur la Figure 1-15.

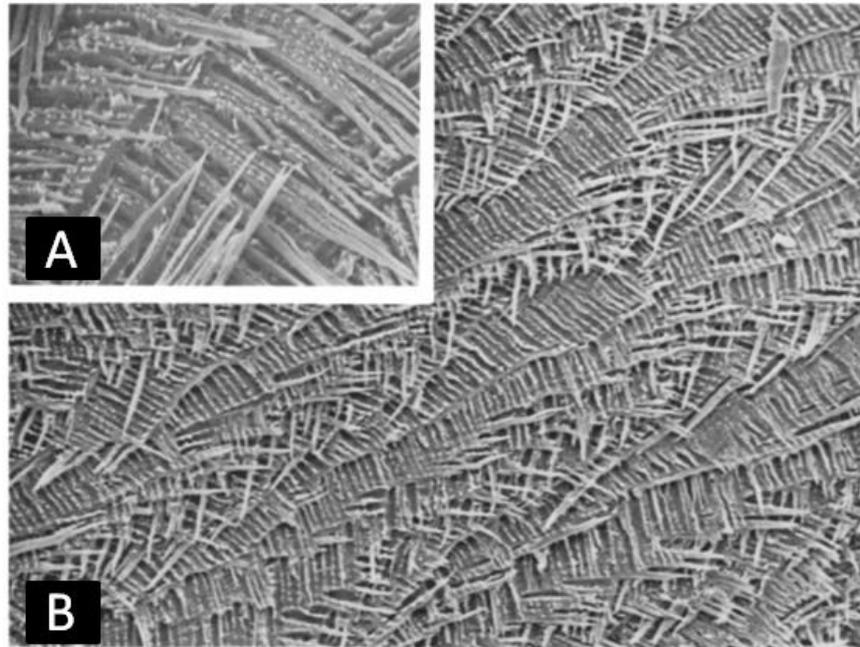


Figure 1-15 : Rotation progressive des couches de fibrilles dans les écailles du coelacanthe (Giraud-Guille, 1978).

Cette rotation est représentée schématiquement dans la Figure 1-16:

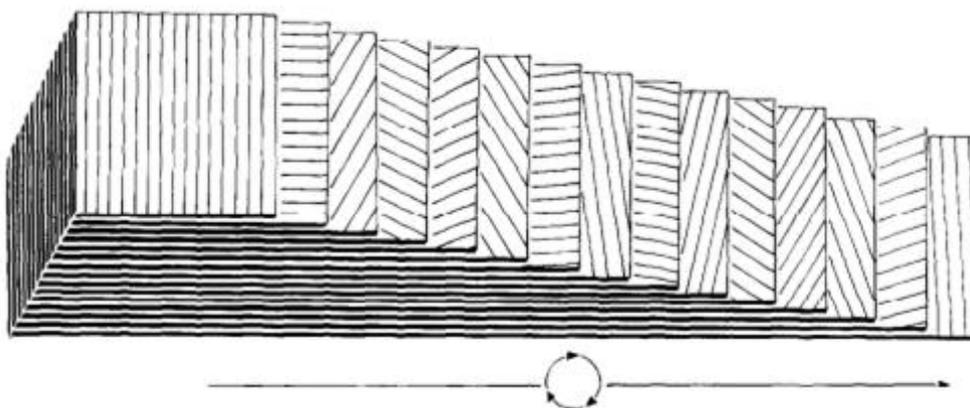


Figure 1-16 : Représentation schématique d'une coupe oblique du tissu de l'écaille. L'orientation des fibres tourne progressivement d'un plan à l'autre dans le sens des flèches. (Giraud Guille, 1978)

Les fibres de collagène forment des couches qui se coupent avec un angle de 12-13°.

Un autre exemple cité précédemment est le cas de l'ADN. L'organisation cholestérique de l'ADN en solution concentrée a été mise en évidence par Livolant en 1986 (Livolant *et al.*, 1986) mais il existe aussi une autre phase dite pré-cholestérique et décrite en 1987 (Livolant *et al.*, 1987) où l'ADN adopte une organisation dite en bandes. Cette organisation est présentée Figure 1-17.

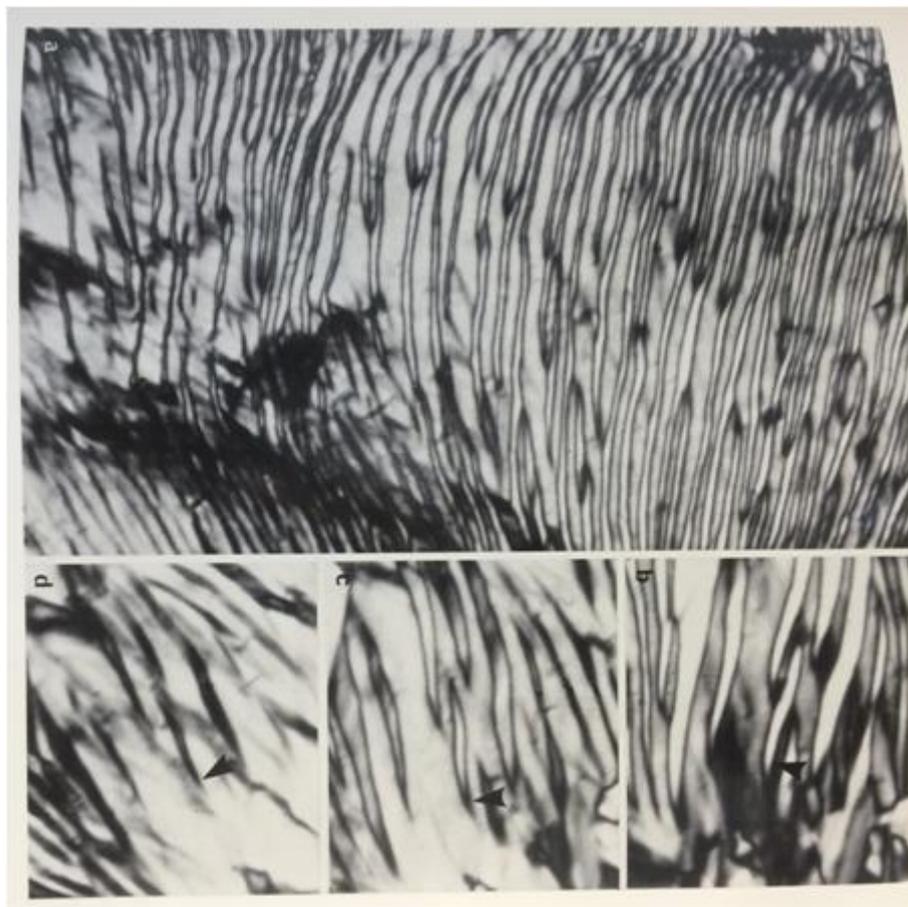


Figure 1-17 : Structure en bandes observée dans une solution d'ADN concentrée. Cette structure évoluerait vers une phase cholestérique par la suite. (Livolant, 1984)

Ces structures sont stables et apparaissent généralement après quelques jours en réponse à une concentration de la solution. Sous lumière polarisée, de larges bandes brillantes apparaissent et sont séparées par des domaines sombres. Les auteurs décrivent que lorsque la plaque du microscope à lumière polarisée est tournée, les lignes noires s'épaississent. Quand ils ajoutent une lame quart d'onde, ils observent une alternance de bandes orange et bleues. Cela indique que les molécules sont obliques dans chaque domaine et que leur orientation change d'une bande à l'autre.

La chiralité de la triple hélice de collagène associée à sa morphologie (300 nm de long pour 1,5 nm de diamètre) lui confère des propriétés d'auto-assemblage en phase cristal-liquide en fonction de la concentration. Cela place le collagène dans les cristaux-liquides lyotropes. Ce sont les similarités entre l'organisation des fibrilles de collagène dans les tissus comme les os ou les tendons et les organisations cristal-liquides de certaines molécules qui ont entraîné les premières références aux phases cristal-liquides dans le

cadre de l'étude du collagène (Bouligand *et al.* 1978). La biréfringence du collagène en solution acide a été observée par Murthy en 1984 (Murthy, 1984). Ensuite, il a été montré que dans une solution d'acide acétique 500 mM (pH=2,5) le collagène pouvait former une phase cholestérique à partir d'une concentration de 80 mg/mL (Giraud-Guille *et al.* 1989; Giraud-Guille *et al.*, 1992).

1.2 Ingénierie tissulaire de la cornée

1.2.1 Anatomie et physiologie de la cornée

La Figure 1-18 donne une représentation schématique transversale de l'œil.

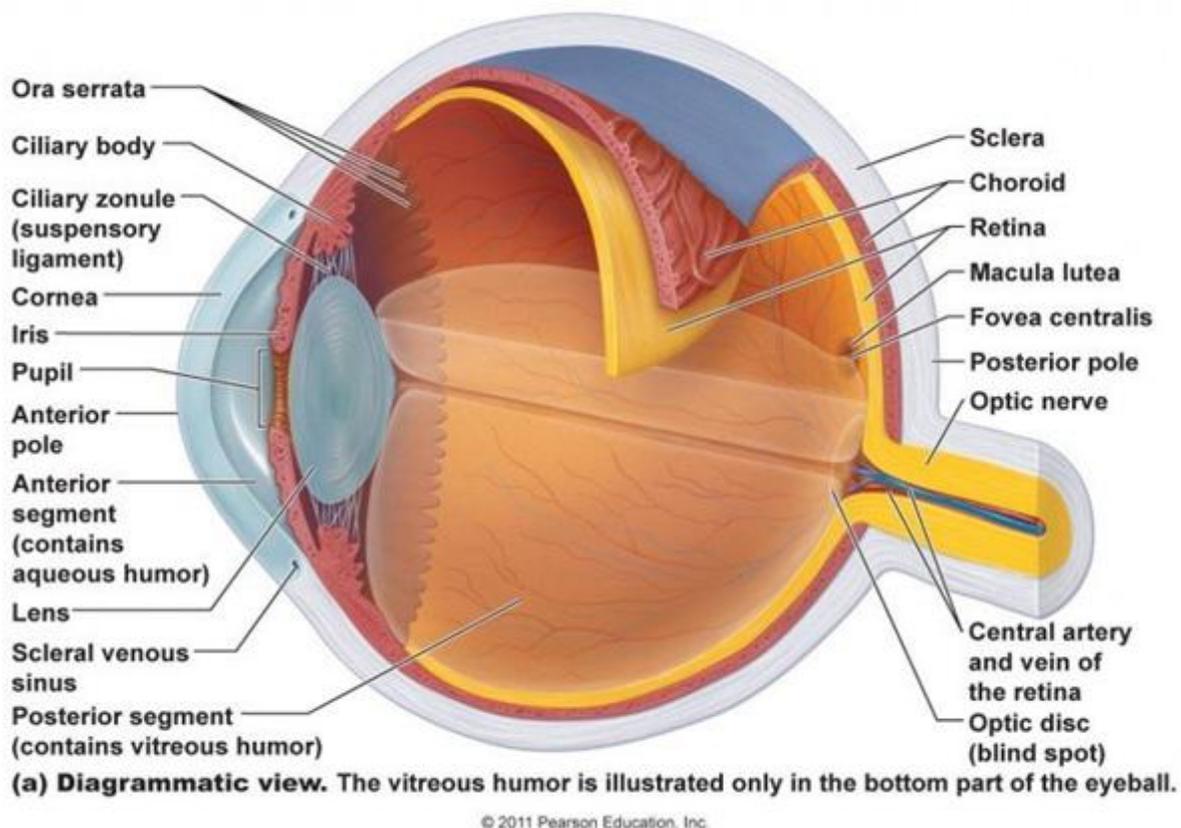


Figure 1-18 : Représentation schématique d'un œil humain.

1.2.1.1 Description rapide de l'œil

Le globe oculaire, qui a un volume de 6,5 cm³ et un diamètre 24 mm environ, est relié par le nerf optique au système nerveux central. On peut séparer l'œil en deux régions. La partie antérieure de l'œil, comprenant la cornée, la sclère, l'humeur aqueuse, le cristallin, l'iris et le corps ciliaire, dont l'ensemble permet de focaliser la lumière au

niveau de la rétine qui, elle, appartient à la partie postérieure de l'œil avec également la choroïde et le corps vitré (Figure 1-18).

Trois tuniques se superposent dans le globe oculaire. La tunique cornéosclérale, la plus externe, suivie de la tunique uvéale et enfin de la tunique rétinienne. C'est la tunique cornéosclérale, la plus rigide, qui donne la forme du globe oculaire. Elle est principalement composée de collagène puisqu'elle comprend la sclère, un tissu opaque, et la cornée qui est transparente. Au niveau de la sclère arrivent et repartent les vaisseaux sanguins de l'œil. La frontière entre la cornée et la sclère est appelée le limbe. C'est là qu'adhère la conjonctive.

La tunique uvéale, intermédiaire, a différents rôles. Elle est composée entre autres de la choroïde, couche vascularisée qui apporte les nutriments nécessaires. Elle comprend également l'iris qui permet de contrôler la quantité de lumière qui entre dans l'œil et le corps ciliaire servant à contrôler la forme du cristallin et de l'épithélium.

Enfin, la tunique rétinienne qui contient la rétine sert, grâce aux photorécepteurs, à transformer le flux lumineux en signal nerveux. La rétine est primordiale pour la détection de la lumière, la distinction des couleurs et la résolution de l'œil.

Avant de décrire précisément la cornée dans le paragraphe suivant, il s'agit de présenter rapidement ici les différentes entités de l'œil en commençant par celles de la partie postérieure puis par celles de la partie antérieure.

- Le corps vitré, transparent, aussi appelé simplement vitré remplit la cavité oculaire derrière le cristallin et est produit par les cellules de la rétine. Il n'est pas vascularisé et est composé de collagène de type II, de glycosaminoglycanes, de vitrosine et d'eau à 98%. Vers 50-60 ans, il se rétracte sur lui-même et est remplacé par un liquide extracellulaire.
- La choroïde qui se trouve entre la sclère et la rétine est la couche vascularisée de l'œil. Elle est de couleur brune.
- La rétine, également transparente, fait environ 0,5 mm d'épaisseur. Elle contient des photorécepteurs qui transforment le signal lumineux en signal sensoriel. Certains récepteurs permettent la vision diurne et sont appelés cônes. On en dénombre environ 5 millions. D'autres, les bâtonnets (120 millions) sont responsables de la vision de nuit. Les photorécepteurs pour la vision de jour se trouvent dans la partie postérieure de la rétine qui s'appelle la macula. La partie centrale de la macula où l'on a la plus forte concentration de cônes s'appelle la fovea. C'est cette zone qui donne l'acuité maximale de l'œil. Les bâtonnets pour la vision de nuit sont dans une zone en périphérie de la macula. Enfin la papille qui est la zone où l'on trouve le début du nerf optique ne comporte pas de photorécepteurs.

- La sclère est pratiquement acellulaire. C'est une membrane opaque qui fait environ 1 mm d'épaisseur.

Le segment antérieur comporte la cornée qui sera décrite dans la partie suivante ainsi que l'iris, le corps ciliaire, le cristallin et l'humeur aqueuse.

- L'iris est la partie colorée de l'œil. L'orifice qu'on trouve en son centre est la pupille. La couleur de l'iris est liée à la mélanine et à la lipofuscine.
- L'humeur aqueuse sert principalement à maintenir la pression intraoculaire. Elle est sécrétée par le corps ciliaire.
- Le cristallin, transparent et sans vascularisation, sert, avec la cornée, à focaliser les rayons au niveau de la rétine. Il est situé derrière l'iris. Son pouvoir de réfraction compte pour 1/3 du pouvoir de réfraction de l'œil. Le cristallin est en contact avec le corps ciliaire grâce à une capsule qui l'entoure (cette capsule est reliée au corps vitré par la zonule cristallinienne) et lorsque les muscles ciliaires se contractent, le cristallin change son rayon de courbure ce qui permet d'accommoder la vision. Le cristallin est composé de plusieurs couches : le noyau embryonnaire, le noyau fœtal, le noyau adulte et enfin le cortex.

1.2.1.2 La cornée

La cornée est la couche externe de l'œil, transparente et avasculaire (Figure 1-19). Elle apparaît ovale depuis la face antérieure et circulaire vue de la face postérieure. Le diamètre moyen horizontal est de 11,7 mm et le vertical de 10,6 mm. Son épaisseur au centre est de 520 μm et atteint environ 650 μm sur la périphérie. La région centrale de la cornée a un rayon de courbure antérieur compris généralement entre 6,75 et 9,25 mm et un rayon de courbure postérieur de 6,6 mm. La face antérieure est convexe et elliptique en contact avec l'air et recouverte d'un film aqueux alors que la face postérieure, concave et circulaire, se trouve directement en contact avec l'humeur aqueuse.

La cornée est l'élément le plus réfractif de l'œil. Elle est responsable de plus de 70% du pouvoir réfractif avec 42 dioptries (47 pour la face antérieure).

Elle est aussi extrêmement innervée avec une densité de terminaisons nerveuses environ 300 à 400 fois plus importante que dans la peau.

De la face antérieure à la face postérieure, la cornée est composée d'un épithélium, de la membrane de Bowman, du stroma, de la membrane de Descemet et enfin de l'endothélium.

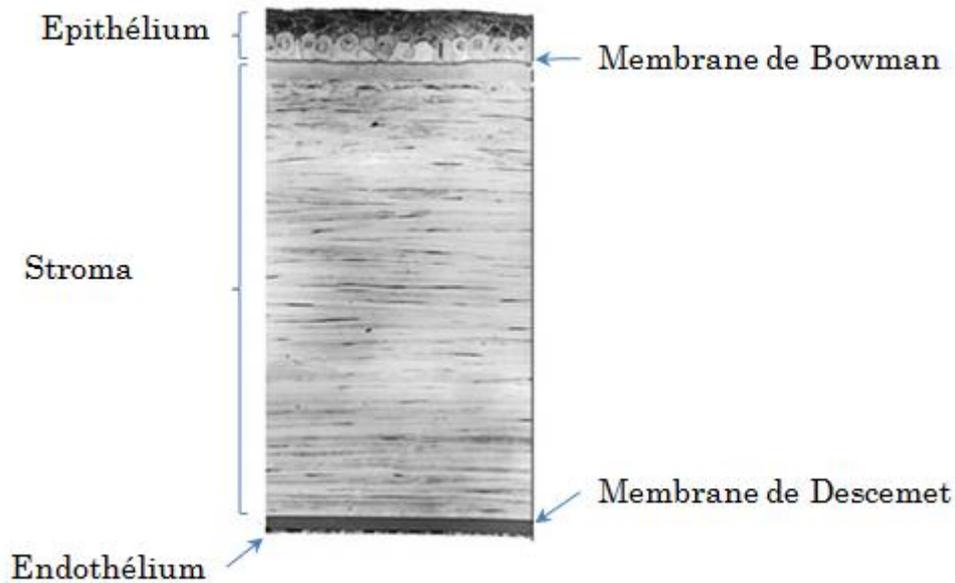


Figure 1-19 : Aspect histologique de la cornée, avec ses cinq couches principales. Le stroma représente 90% de l'épaisseur cornéenne et est majoritairement composé de collagène de type I organisé en contreplaqué.

L'épithélium fait environ 50 μm d'épaisseur et représente donc environ 10% de l'épaisseur de la cornée. Il faut distinguer de l'épithélium, le limbe qui se trouve en périphérie de celui-ci. L'épithélium cornéen est en continuité avec l'épithélium limbique lui-même en continuité de l'épithélium conjonctival. Les trois épithélia forment la surface oculaire. L'épithélium cornéen est un épithélium pavimenteux stratifié non-kératinisé composé de trois assises cellulaires qui représentent 5 à 8 couches cellulaires (Figure 1-20).

L'assise superficielle est composée de deux couches de cellules squameuses de forme allongée. Ces cellules présentent à leur surface des digitations qui permettent une bonne adhérence du film lacrymal. Au moment de leur mort, la desquamation de ces cellules crée des zones de dépression à la surface qui vont être comblées par le film lacrymal. Les cellules superficielles mortes sont ensuite remplacées par des cellules intermédiaires (wing cells) sous-jacentes.

L'assise intermédiaire est formée par 2 à 3 couches de ces cellules polyédriques ou cellules ailées (wing cells). Elles forment beaucoup de jonctions entre elles.

Enfin, il y a la couche basale qui est monostratifiée et constituée de cellules polygonales. Les très nombreuses jonctions entre les cellules épithéliales permettent la formation d'une barrière à la surface de la cornée. Dans cette couche se trouvent les progéniteurs. Ce sont des cellules amplificatrices transitoires. Les divisions ont lieu dans cette couche

basale puis les cellules se différencient et migrent dans la couche intermédiaire et enfin dans la couche superficielle où elles meurent et desquament dans le film lacrymal.

Les trois assises cellulaires reposent également sur une membrane basale synthétisée par les cellules épithéliales et qui fait environ 0,80 μm . Les cellules épithéliales sont connectées à la membrane basale par des hémidesmosomes. Ces structures sont importantes pour l'encrage cellulaire en réponse à une éventuelle blessure au niveau de l'épithélium.

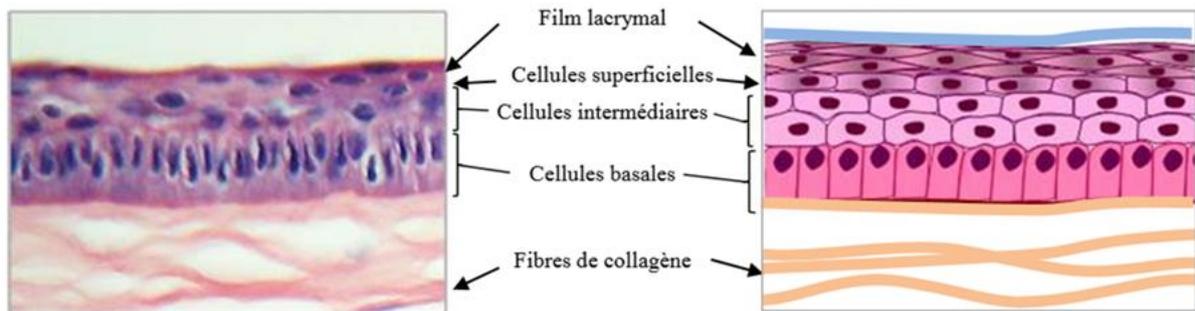


Figure 1-20 : L'épithélium, première couche de la cornée. On voit les différentes couches cellulaires de l'épithélium avec leurs formes caractéristiques. La couche superficielle est composée de cellules ailées (image tirée de la thèse d'E. Collomb, 2010)

La membrane basale, constituée surtout de collagène IV et de protéoglycanes à héparane sulfate sépare l'épithélium de la membrane de Bowman. Cette dernière est acellulaire et a une épaisseur comprise entre 8 et 12 μm . Elle est constituée de fibrilles de collagène de type I désorganisées qui la lient au stroma et aussi de collagène de type IV. Cette membrane n'est pas régénérée en cas de blessure.

Le renouvellement de l'épithélium

L'épithélium est constamment renouvelé grâce à un système de migration et de différenciation cellulaire (Figure 1-21). Plusieurs explications ont été données pour expliquer le renouvellement de l'épithélium cornéen. La théorie de Shapiro *et al.* (1981), suppose que l'épithélium cornéen est d'origine conjonctivale.

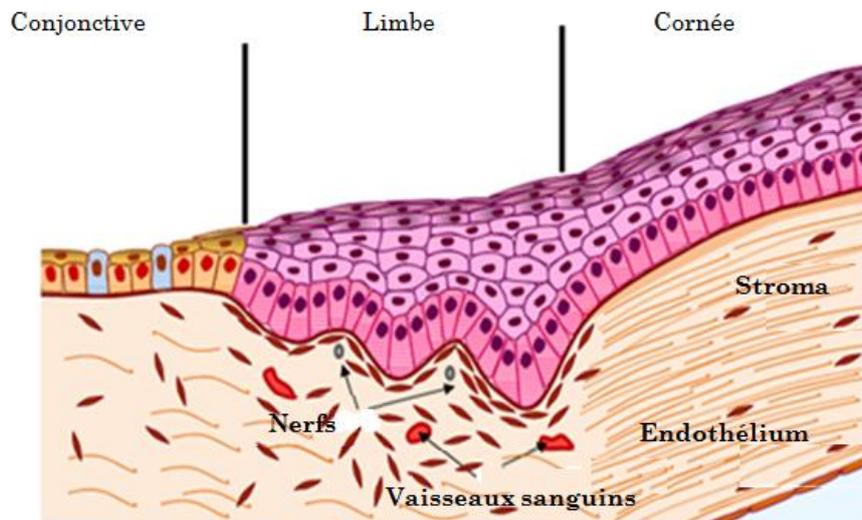


Figure 1-21 : Localisation du limbe et de la conjonctive par rapport à la cornée. Au niveau de la couche basale du limbe se trouvent les cellules souches pour la régénération de l'épithélium. Il y a à ce niveau une structure en niche avec une vascularisation (image tirée de la thèse d'E. Collomb, 2010).

Thoft & Friend (1983) reprennent également cette théorie qui suppose l'existence d'un flux constant de cellules épithéliales de la conjonctive vers le centre de la cornée. En arrivant au niveau de la membrane de Bowman, la trans-différentiation des cellules de la conjonctive en épithélium est induite. Une autre théorie, développée par Kruse (Kruse, 1994), soutient que ce sont les cellules souches limbiques qui se trouvent dans la couche basale du limbe qui assurent le renouvellement de l'épithélium. Shapiro *et al* (1981) avaient observé une cicatrisation d'origine conjonctivale chez le lapin car il y avait eu ablation des cellules limbiques (Dua *et al.*, 1990). Cette cicatrisation d'origine conjonctivale s'accompagne d'une vascularisation. A la différence de Shapiro *et al* (Shapiro *et al.*, 1981), Kruse a observé la cicatrisation d'un épithélium de lapin dans le cas où les cellules limbiques n'étaient pas affectées. Finalement, c'est la théorie des cellules limbiques qui est aujourd'hui retenue (Kruse, 1994). Il existe une théorie plus récente développée par Majo *et al.* (Majo *et al.*, 2008) qui stipule que des cellules souches épithéliales sont présentes sur l'ensemble de la surface oculaire avec une densité maximale au niveau du limbe.

Le renouvellement de l'épithélium est donc assuré par un processus impliquant des cellules souches indifférenciées situées dans la couche basale du limbe. En se divisant, elles forment des cellules transitoires qui se déplacent vers la cornée centrale où elles acquièrent le phénotype des cellules épithéliales. Ensuite, elles migrent de façon verticale en perdant de leur activité mitotique puis deviennent des cellules hyperdifférenciées qui ne se multiplient plus (Figure 1-22). Elles finissent par disparaître dans le film lacrymal. Cette théorie est confortée par les observations de

Kenyon *et al.* qui ont pu reconstruire un épithélium à partir de cellules souches transplantées *in vivo* (Kenyon *et al.*, 1989)

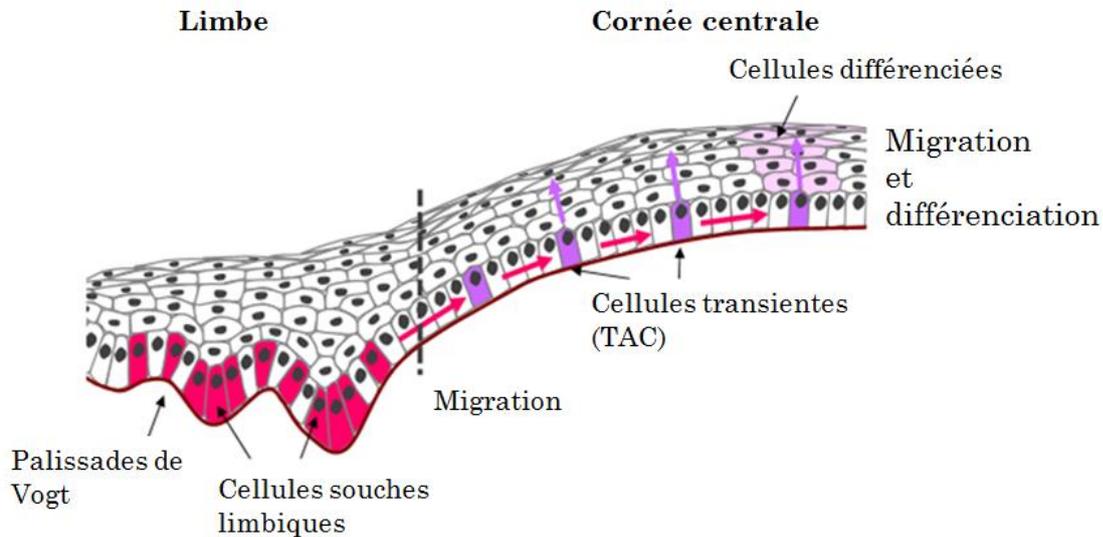


Figure 1-22 : Les cellules souches limbiques se trouvent au niveau de ce qu'on appelle les palissades de Vogt. Quand elles se divisent, elles forment des cellules transitoires (TAC) qui migrent vers la cornée (image tirée de la thèse d'E. Collomb, 2010).

Le stroma a une épaisseur d'environ 500 μm soit environ 90% de l'épaisseur cornéenne. Il est essentiellement formé de matrice extracellulaire, de fibrilles de collagène et de kératocytes. Dans le stroma, les fibrilles de collagène s'arrangent en lamelles qui ont une organisation particulière dite en contreplaqué. C'est-à-dire qu'au sein d'une lamelle les fibrilles sont quasi parallèles et les fibrilles de la lamelle adjacente vont dans une direction perpendiculaire comme le montrent le cliché TEM et le schéma ci-dessous (Figure 1-23). Il y a un angle proche de 90° entre les couches. Ces lamelles sont composées d'hétérofibrilles de collagène I et V, le collagène V se trouvant au centre et le collagène I en périphérie. Il y a également du collagène VI, un peu de collagène XII, III et IV (voir Annexe 2). Les lamelles ne sont pas toutes parallèles à la courbure de la cornée. Certaines quittent la membrane de Descemet avec un angle de 23° . En outre, les domaines organisés en contreplaqué sont plus grands du côté postérieur où ils font entre 60 et 120 μm que du côté antérieur où leurs tailles varient entre 10 et 40 μm . Les lamelles ont une épaisseur variables allant de 0,2 à 2,5 μm . Il existe aussi des lamelles transverses qui joignent les côtés antérieur et postérieur. Le nombre total de lamelles dans l'épaisseur du stroma est compris entre 300 et 500. Le diamètre des fibrilles, qui est entre 25 et 35 nm et l'espace interfibrillaire, d'environ 40-44 nm (Maurice, 1957) sont vitaux pour la transparence de la cornée. Le collagène I constitue environ 90% en poids de la matrice extracellulaire (Figure 1-23).

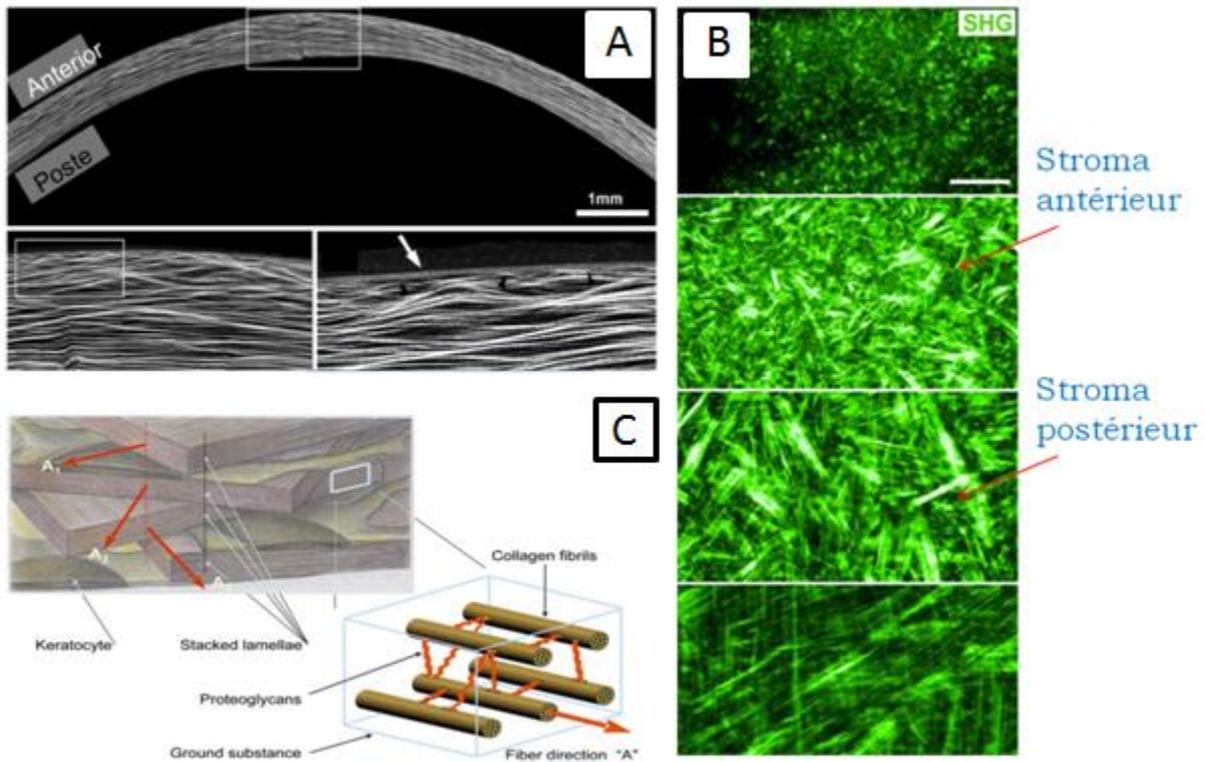


Figure 1-23 : Organisation en contreplaqué du collagène I chez le Lapin (A) vue par microscopie confocale haute résolution. Au sein de chaque lamelle les fibrilles vont à peu de chose près dans la même direction, mais changent brutalement, d'environ 90° dans la lamelle adjacente (B, C) Les domaines organisés font entre 10 et 120 μm . Le stroma postérieur comporte des domaines organisés plus grands que le stroma antérieur (B) Les lamelles ne sont pas toutes parallèles à la courbure. Elles ont en moyenne une petite largeur de 10 μm et une épaisseur de 2 μm . A : tiré de Thomasy *et al.*, 2013 ; B : Aptel *et al.*, 2010 ; C : Pinsky *et al.*, 2005.

Dans la MEC (matrice extracellulaire) on trouve également du collagène de type III et V et des glycosaminoglycanes comme le kératane sulfate, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate ou des protéoglycanes, tel le lumécane. Les protéoglycanes ont leur importance dans le maintien d'un espace interfibrillaire fixe (Scott, 2007). Ils ont aussi un rôle important dans les mécanismes d'hydratation de la cornée car ils sont très hydrophiles et hyperhydratés. Les protéoglycanes sont chargés négativement ce qui assure la pression de gonflement du stroma. L'espace interfibrillaire est aussi important pour la transparence dans la mesure où il limite la diffusion de la lumière.

Enfin, les kératocytes du stroma sont responsables de la biosynthèse du collagène et des autres éléments de la matrice extracellulaire et se trouvent entre les lamelles de collagène (Hay *et al.*, 1979). Les kératocytes sont des fibroblastes qui proviennent de la migration des cellules des crêtes neurales. Ils sont connectés dans le stroma par de longues extensions cytoplasmiques (Jester *et al.*, 1994). Lors d'un dommage occasionné dans le stroma, les kératocytes, quiescents, sont activés en fibroblastes qui vont synthétiser une nouvelle MEC désorganisée. Les fibroblastes peuvent se différencier de manière irréversible en myofibroblastes afin de permettre la contraction de la plaie (ceci sera vu dans le détail plus loin). Tout ceci entraîne la formation d'une cicatrice opaque.

Du côté postérieur du stroma se trouve la **membrane de Descemet** qui correspond à la membrane basale de l'endothélium. Elle a une épaisseur de 8 à 12 μm et est constituée de deux parties distinctes. La partie antérieure (ABZ pour Anterior Banded Zone) qui est donc en contact avec le stroma, fait 3 μm et est caractérisée par la présence de collagène VIII. La partie postérieure (PNBZ pour Posterior Non Banded Zone) en contact avec l'endothélium est constituée de collagène IV. Les fibrilles de collagène baignent dans une matrice glycoprotéique. Cette membrane s'épaissit au cours de la vie.

La dernière couche, **l'endothélium**, est directement en contact avec l'humeur aqueuse. Il est formé d'une monocouche d'environ 400 000 cellules hexagonales étroitement reliées entre elles par des jonctions serrées (Figure 1-24). Ces cellules régulent le degré d'hydratation du stroma grâce à leur interdigitations.

La surface basale de l'endothélium est maintenue à la membrane de Descemet par un système de pompes. Les cellules de l'endothélium disposent en effet de nombreuses pompes Na^+ , K^+ et ATPase. La densité et la topographie des cellules endothéliales changent avec le temps. Entre la seconde et la huitième année de la vie, la densité cellulaire passe de 4000 cellules/ mm^2 à environ 2600 cellules/ mm^2 . En outre, le pourcentage de cellules hexagonales diminue de 75% à 60%. En moyenne, la densité de cellules endothéliales chute de 0,6% par an. Le stroma contient environ 78% d'eau et, comme indiqué ci-dessus, ce niveau d'hydratation est maintenu et régulé par les cellules endothéliales. La sécrétion de bicarbonate et de Na^+ dans l'humeur aqueuse crée un gradient osmotique qui équilibre la tendance au gonflement du stroma. Les cellules endothéliales n'ont pas d'activité mitotique *in vivo*. La chute de la densité cellulaire avec l'âge est compensée par le fait que les cellules endothéliales peuvent s'étirer pour combler l'espace laissé libre par les cellules mortes. Cependant, le remodelage des cellules entraîne la perte de leur forme hexagonale. Si la densité de cellules endothéliales tombe en dessous de 500 cellules/ mm^2 , le risque de développer un œdème cornéen apparaît. Une augmentation de la taille des cellules, associée à une variation de leur forme entraîne une diminution de la capacité de ces cellules à maintenir le stroma dans son état normal d'hydratation.

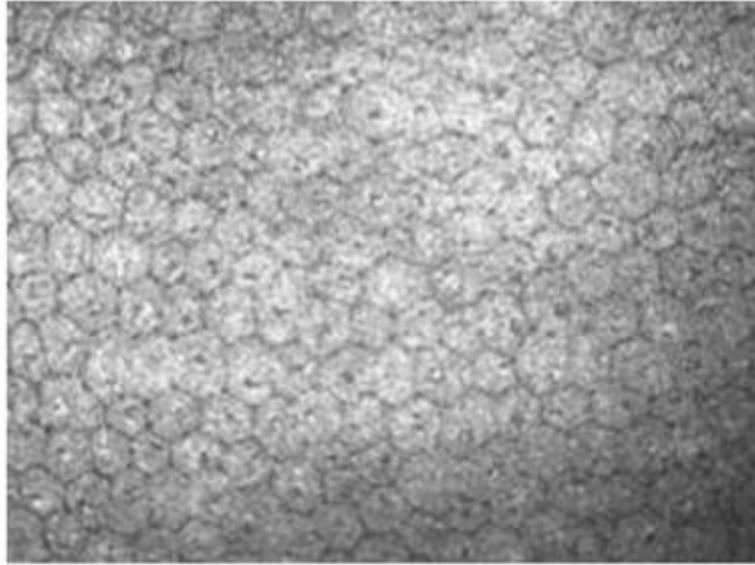


Figure 1-24 : Cellules endothéliales, avec leur forme hexagonale caractéristique (d'après Allouch-Nahmias *et al.*, 2011)

1.2.2 Développement des différentes couches de la cornée

1.2.2.1 Introduction

Comme nous l'avons rappelé précédemment, la cornée contient trois couches cellulaires qui ont deux origines distinctes : l'ectoderme pour l'épithélium et la crête neurale dérivée du neuro-ectoderme pour les kératocytes et l'endothélium. L'ectoderme est le feuillet externe de l'embryon. Il se met en place lors de la gastrulation. L'épithélium stratifié, qui couvre la majeure partie de la cornée, descend directement de l'ectoderme. Le stroma et l'endothélium proviennent des cellules de la crête neurale (Figure 1-25). Tous les différents types cellulaires sont d'abord rassemblés dans la partie antérieure de l'œil pour former la cornée précoce. S'ensuivent différents événements de signalisation moléculaire et des interactions cellulaires qui induisent la différenciation des trois couches cellulaires et la formation concomitante de la cornée.

Au cours des premiers stades du développement, les régions bilatérales de l'ectoderme se spécifient pour former notamment la placode cristalline. Ce sont les excroissances bilatérales du neuroderme du prosencéphale, une autre entité embryonnaire, qui forment les vésicules optiques. L'invagination du neuroderme conduit ensuite à la formation de la rétine neurale et de la rétine pigmentaire. L'invagination de la vésicule optique, causée par l'action de cellules de la crête neurale, entraîne la formation de la cupule optique et l'épaississement de la placode cristalline. L'iris provient des bords de la cupule optique. Ensuite la placode cristalline s'invagine pour donner place à la vésicule cristallinienne qui formera à terme le cristallin. L'ectoderme encore en place forme

l'épithélium alors que les cellules de la crête neurale migrent entre l'épithélium précoce et la vésicule cristallinienne pour donner le stroma et l'endothélium. Les cellules de la crête neurale participent aussi à la formation de la sclère. Ce sont des cellules multipotentes et progénitrices des cellules stromales et de l'endothélium, originaires du tube neural (appartenant au système nerveux primaire), qui se trouvent dans une région centrale de l'embryon. Le gène le plus important qui contrôle le développement oculaire est le gène Pax6.

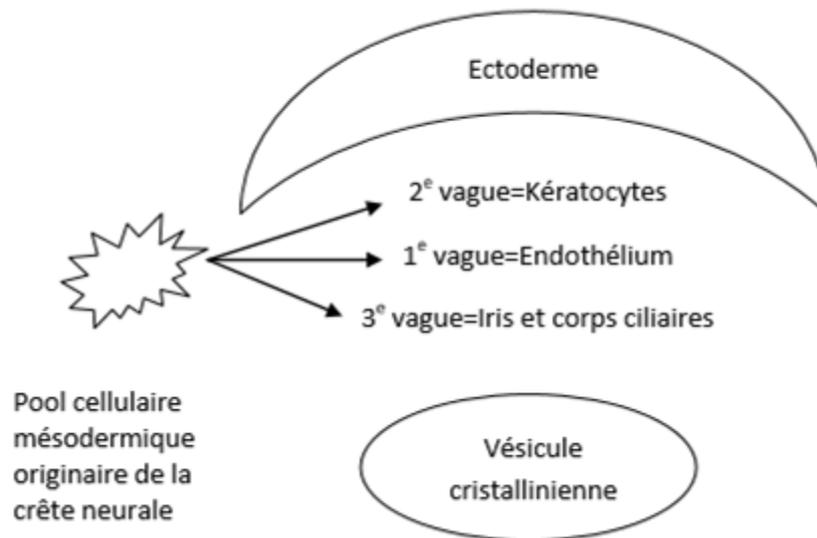


Figure 1-25 : Schéma simplifié de la formation embryonnaire de la cornée (figure tirée de C. Mouton, 2012).

1.2.2.2 Développement de l'épithélium cornéen

L'épithélium se forme à partir de l'ectoderme restant après formation de la vésicule cristallinienne. Ce sont en effet les interactions entre l'ectoderme et la placode cristalline qui entraînent la formation du stroma primaire. Le stroma primaire, où a lieu le début de la fibrillogénèse, est synthétisé par l'épithélium primaire. Au début de la formation du stroma les cellules basales ont déjà leur apparence cuboïde qui les distingue des cellules des couches superficielles. Les cellules de l'épithélium expriment la kératine K12. Chez l'homme, après 2 mois de développement, l'épithélium a seulement 2 couches cellulaires. Il en a 3 à 4 après 4 mois et il est pleinement stratifié à la naissance.

1.2.2.3 Développement de l'endothélium

Le développement de l'endothélium commence lorsque les cellules de la crête neurale migrent entre l'épithélium primaire et la vésicule cristallinienne. Les cellules forment une monocouche à la surface postérieure de la cornée. Chez l'homme, la formation de l'endothélium est liée à une première migration des cellules de la crête neurale dans la

région où la cornée commence à se former. Le premier marqueur de l'endothélium est la N-cadhérine, une molécule d'adhésion cellulaire qui apparaît rapidement dans le développement de la cornée. Elle est impliquée dans la transformation des cellules neurales en cellules de type épithéliales et dans la formation de la monocouche. Des études ont montré que la sous-expression de la N-cadhérine est nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale, mais que sa surexpression est importante pour la formation des jonctions cellulaires dans l'endothélium. Il faut environ 8 semaines de gestation pour que la monocouche soit formée. Chez l'homme, l'endothélium exprime le marqueur de pompe $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. Peu de temps après la formation de l'endothélium, celui-ci synthétise la membrane de Descemet qui joue un rôle essentiel chez l'homme dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium.

1.2.2.4 Développement du stroma

C'est la dernière couche de la cornée à se développer. Sa formation est initiée par une seconde migration des cellules des crêtes neurales entre l'épithélium et l'endothélium. Les cellules prolifèrent rapidement et ont une morphologie de cellule mésenchymateuse. Elles synthétisent les composants de la matrice extracellulaire dans laquelle elles adoptent la morphologie et le phénotype des kératocytes. C'est à ce moment-là qu'est détectée la première expression de collagène et de protéoglycanes. La synthèse et la distribution du collagène dans le stroma au moment de son développement sont décrites par Quantock and Young (Quantock & Young, 2008). Les collagènes de type I et V sont synthétisés par les cellules stromales tandis que le collagène de type II provient de l'épithélium. D'autres types de collagène tels que le VI, IX, VII et XIV sont présents dans la cornée en développement et jouent un rôle dans le maintien de son intégrité structurale.

Les interactions entre les différents types de collagènes et les protéoglycanes sont essentielles pour la fibrillogenèse et la formation de la matrice extracellulaire et donc pour la transparence de la cornée.

1.2.3 Innervation de la cornée

Dans la cornée, on trouve de 70 à 90 faisceaux nerveux qui contiennent environ 1200 axones en moyenne et qui proviennent des nerfs ciliaires. Si le stroma moyen et le stroma antérieur sont innervés, ce n'est pas le cas du stroma postérieur et de la membrane de Descemet. C'est sous la membrane de Bowman qu'on trouve les plexi-nerveux sous-épithéliaux. Leurs fibres traversent la membrane de Bowman. Ces nerfs qui pénètrent dans la membrane de Bowman donnent naissance à une multitude d'autres nerfs pour former un autre réseau avec plus de branchements. Ils peuvent aussi former une structure en forme de bulbe (Figure 1-26B) avec de multiples branchements juste avant de pénétrer dans la membrane.

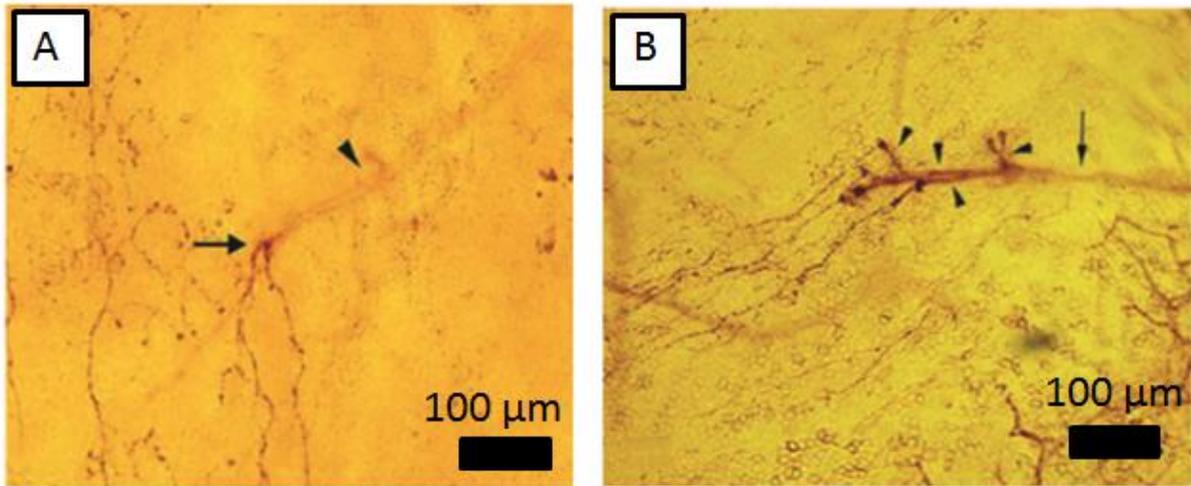


Figure 1-26 : Photographie de la cornée marquée avec la technique de l'acétylcholinestérase. Un nerf provenant du réseau sous-épithélial (signalé par la tête de flèche seule) pénètre dans la membrane de Bowman et donne naissance à d'autres nerfs dans le stroma (A). Le point de perforation est indiqué par la flèche. En B on peut voir les multiples « branches » se formant juste avant que le nerf ne perfore la membrane. Les points de contact des nouveaux branchements avec la membrane sont indiqués par les têtes de flèche (figures tirées et adaptées de Al Aqaba *et al.*, 2010).

Il y a donc des terminaisons nerveuses sensibles dans le stroma et dans les différentes couches de l'épithélium. Cependant on en trouve davantage en périphérie qu'au centre de la cornée comme l'illustre la Figure 1-27.

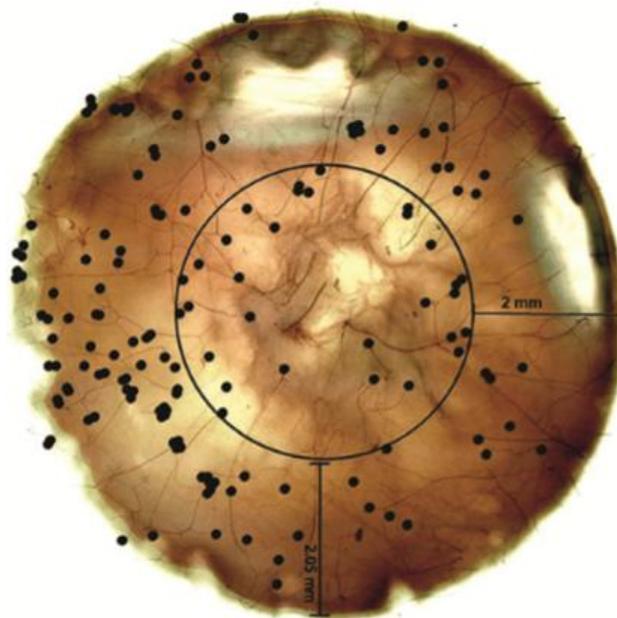


Figure 1-27 : Photomicrographie de l'ensemble de la cornée (montage de 37 images) où l'on peut voir tous les sites de perforation, marqués par points noirs, de la membrane de Bowman. Ces sites sont préférentiellement localisés dans la zone périphérique de la cornée. On dénombre une trentaine de sites dans la partie centrale contre plus de 100 dans la zone périphérique (figure tirée de Al Aqaba *et al.*, 2010).

On relève trois types de récepteurs sensoriels (nocicepteurs) dans la cornée. Les nocicepteurs polymodaux représentent 70% des récepteurs tandis que les récepteurs mécano nociceptifs et les récepteurs au froid représentent respectivement 20% et 10% des récepteurs cornéens.

L'innervation cornéenne a plusieurs rôles. Le réflexe cornéopalpebral dont elle est responsable, permet de répartir le film lacrymal et de protéger ainsi la cornée des agressions extérieures. L'innervation exerce aussi un rôle trophique sur l'épithélium.

1.2.4 Réactions de la cornée aux blessures

1.2.4.1 Cas de l'épithélium

Dès qu'une portion d'une cellule épithéliale est touchée, c'est en général toute la cellule qui est perdue, entraînant l'apparition d'un défaut dans l'épithélium. Les blessures les plus courantes de l'épithélium sont d'origine mécanique mais elles peuvent aussi être d'origine chimique voire être causées par une brûlure.

Quand une cassure dans la barrière épithéliale est causée par une contrainte mécanique, les cellules à proximité commencent à couvrir le site endommagé par migration et étalement. Ce mécanisme est précédé par des changements quasi instantanés d'ordre physiologique et anatomique comme la création d'extensions dans la membrane cellulaire, la disparition de l'adhésion des hémidesmosomes à la membrane basale et une augmentation de la production d'énergie par les mitochondries. Les cellules épithéliales peuvent recouvrir la zone blessée à hauteur de 60 à 80 μm par heure. Généralement, après une trentaine d'heures, la mitose se met en place pour restaurer la population de cellules épithéliales. Seules les cellules basales, transitoires, et les cellules souches limbiques participent à cette mitose reconstructive.

1.2.4.2 Cas du stroma

La séparation du stroma des autres couches cellulaires par les membranes de Bowman et Descemet est nécessaire pour une homéostasie normale de la cornée. Une perturbation dans cette structure entraîne l'activation du processus de cicatrisation du stroma. Il y a trois étapes dans ce processus : la réparation, la régénération et le remodelage. De la même façon que pour la peau, la cicatrisation du stroma met en jeu une coopération complexe entre des cytokines, des facteurs de croissance et des chimiokines. Il existe cependant une différence majeure puisque qu'il n'y a pas intervention d'une composante vasculaire dans la cicatrisation du stroma.

L'activation et la migration des kératocytes constituent les premières actions en réponse à une blessure dans les heures qui la suivent. Ces kératocytes adoptent alors un comportement et une forme se rapprochant des fibroblastes. A proximité de la zone

dégradée, les kératocytes se mettent en apoptose dans les 4 heures et activent les kératocytes adjacents dans le but de contrôler la cicatrisation.

Dans les deux semaines suivant la blessure, des myofibroblastes avec des propriétés contractiles arrivent sur le site endommagé et participent au remodelage du stroma. Ces cellules voient une augmentation de l'expression de MMPs, famille d'enzymes responsables du remodelage de matrice extracellulaire, des interactions entre matrice et cellules, du recrutement des cellules inflammatoires ainsi que de l'activation des cytokines. Comme dans d'autres tissus, les MMPs ont un rôle primordial dans la réorganisation du collagène dans les zones blessées. Il a été proposé que la surexpression des MMPs associée à l'activation des cytokines puisse être responsable de la perte de l'isoforme du collagène IV présent dans la membrane basale, entraînant ainsi la formation d'une cicatrice. Les interactions entre les cytokines, les MMPs et autres médiateurs régulent le processus de cicatrisation qui peut prendre des mois, voire des années, et causer une diminution de la transparence de la cornée.

1.2.4.3 Cas de l'endothélium

En dehors des blessures pénétrantes sur toute l'épaisseur cornéenne, les œdèmes de l'endothélium entraînent principalement une distorsion focale de la couche cellulaire. Cette perturbation est semblable aux effets causés par une courbure excessive de la cornée. Aussi, comme les cellules endothéliales ne peuvent se reproduire, les cellules endommagées sont remplacées par un étalement des cellules voisines et la migration d'autres cellules. Le processus menant au recouvrement de la surface endommagée comprend trois étapes et peut durer plusieurs mois. L'étape initiale est caractérisée par la mise en place d'une première couverture de la zone par migration de cellules endothéliales adjacentes. Elles forment alors une barrière incomplète avec peu de pompes ioniques et des jonctions imparfaites. Dans un second stade, les jonctions serrées et donc le nombre de pompes ioniques retrouvent un niveau normal. Les cellules endothéliales forment des polygones irréguliers, la cornée retrouve son épaisseur et la transparence est rétablie. La dernière étape consiste à remodeler les cellules endothéliales pour qu'elles forment des polygones un peu plus réguliers, ce qui peut prendre des mois.

1.3 Etat de l'art : cornée artificielle

Une blessure et/ou une déficience des cellules cornéennes et limbiques, voire une infection, peuvent conduire à une perte partielle ou totale de la transparence. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies de la cornée sont la deuxième cause de perte de la vision après la cataracte (Whitcher *et al.*, 2001). Les ulcères cornéens et les traumatismes oculaires entraînent 1,5 à 2 millions de nouveaux cas de cécité dans le monde chaque année. La cécité cornéenne affecte environ 10 millions de

personnes dans le monde. L'allogreffe est la meilleure solution pour traiter la cécité cornéenne : il s'agit d'une kératoplastie. Cette technique est très efficace à court terme mais un taux de rejet de 15% mène à 10% d'échec dans les deux ans selon les données obtenues en Suède (Claesson *et al.*, 2002). A long terme, le taux d'échec des allogreffes augmente sensiblement selon Williams *et al.* (Williams *et al.*, 2005). En effet, seulement 55% des greffes sont encore en place 10-15 ans après l'opération. Dans le cas de patients atteints par exemple du syndrome de Stevens-Johnson (SJS) ou dont la cornée a été sévèrement endommagée par une vascularisation ou une brûlure chimique, l'allogreffe est bien moins supportée. Le taux de succès devient quasiment nul si, en plus, une seconde greffe est nécessaire (Khan *et al.*, 2001). Le manque de donneurs est, comme dans le cas des autres organes, un problème supplémentaire et, sans doute, le plus important. En plus du manque de donneurs, un autre problème de l'allogreffe est le risque de propagation d'infections.

Bien que beaucoup d'efforts aient été faits pour développer des substituts cornéens, l'allogreffe, remplaçant la cornée dans toute son épaisseur, est restée le « gold standard ». Dans le cas où l'endothélium est intact, la kératoplastie lamellaire est possible et consiste à ne retirer que la partie endommagée de l'épithélium et du stroma.

Ces dernières années il y a eu nombre d'avancées que ce soit dans le domaine des biomatériaux et/ou en utilisant des méthodes basées sur les cellules souches afin de remplacer en partie ou en totalité la cornée malade ou endommagée.

1.3.1 Cornées artificielles déjà utilisées ou en essai clinique

Les cornées artificielles aujourd'hui utilisées sont totalement synthétiques et destinées à remplacer la partie opacifiée de la cornée. Les premiers dispositifs faits de matériaux rigides entraînaient des opérations complexes et les complications étaient très nombreuses, allant de l'extrusion au glaucome en passant par des infections. La rigidité, l'impossibilité pour les nutriments et l'oxygène de diffuser, ainsi que la faiblesse de la bio-intégration, sont également liées aux nombreux échecs. En plus de la transparence, d'un indice de réfraction adéquat et de propriétés mécaniques permettant d'assurer la fonction de barrière, des propriétés telles que la perméabilité aux nutriments et à l'oxygène, nécessaires pour la survie des cellules alentours, ainsi que la capacité à être colonisé par les cellules stromales de l'hôte sont primordiales pour une bonne intégration et pour éviter une inflammation (Hicks *et al.*, 2002; Griffith *et al.*, 2002). Il faut en outre éviter la vascularisation et l'opacification, synonyme d'une importante réponse inflammatoire conduisant à la biodégradation ou à la calcification du substitut cornéen. Dès 2001, Chirila développa un système basé sur une ceinture flexible, contenant des pores interconnectés de diamètre compris entre 10 et 30 μm , entourant une partie centrale transparente (Chirila, 2001). Le fait que la ceinture soit poreuse permet aux fibroblastes de croître et à la MEC de se déposer d'une manière similaire à ce qui a lieu dans le processus de cicatrisation pour permettre un meilleur ancrage du système

(Trinka-Randall, 2000; Griffith *et al.*, 2002, 2005). La détérioration des tissus de la ceinture et l'extrusion de la cornée artificielle sont les principales causes des échecs liés à cette technique. En 2001, Kahn *et al.* proposent de recouvrir l'implant avec du tissu autologue (Kahn *et al.*, 2001). La surface postérieure de l'implant devait alors inhiber l'attachement cellulaire dans le but d'empêcher la formation d'une membrane fibreuse opaque, autre inconvénient notable (Griffith *et al.*, 2002). La nécessité de recouvrir la face antérieure de la cornée artificielle par une couche de cellules épithéliales confluentes a en revanche été moins étudiée. Cela est supposé améliorer la stabilité à long terme de l'implant, éviter l'infection bactérienne et protéger l'épithélium de la décroissance cellulaire (Griffith *et al.*, 2002, 2005). L'optique centrale, en plus d'être transparente, possède un indice de réfraction similaire à celui de la cornée normale.

L'utilisation de systèmes très hydrophiles comme les hydrogels de poly(2-hydroxyméthyl méthacrylate) (pHEMA) a permis de résoudre les problèmes d'extrusion, d'inflammation et de réactions immunitaires bien que des problèmes de calcification aient été signalés (Vijjasekaran *et al.*, 2000). Des essais cliniques menés sur AlphaCor Kpro (Crawford *et al.*, 2002) ont montré que le système, d'épaisseur cornéenne, était bien intégré dans la cornée grâce au recrutement de fibroblastes dans la partie périphérique de l'implant mais il n'y a pas eu de colonisation cellulaire sur la face antérieure du pHEMA. Il n'y a pas d'informations quant à la croissance de nerfs.

AlphaCor™ Kpro a été utilisé comme une alternative à la greffe de tissus de donneurs sur des patients pour qui une greffe classique présentait un risque d'échec trop élevé. Un certain nombre d'études ont décrit l'implantation de AlphaCor™ Kpro sur des patients avec diverses maladies (Hicks *et al.*, 2002, 2003, 2005; Crawford *et al.*, 2005) ce qui a permis de déceler différents problèmes comme une faible bio-intégration ou la formation d'une membrane « retroprosthetic » et une baisse des propriétés optiques (Hicks *et al.*, 2003, 2006).

Une autre cornée artificielle a été beaucoup étudiée : la Boston Kpro™ (Figure 1-28) développée à l'origine par Dohlman-Doane (Doane *et al.*, 1996).

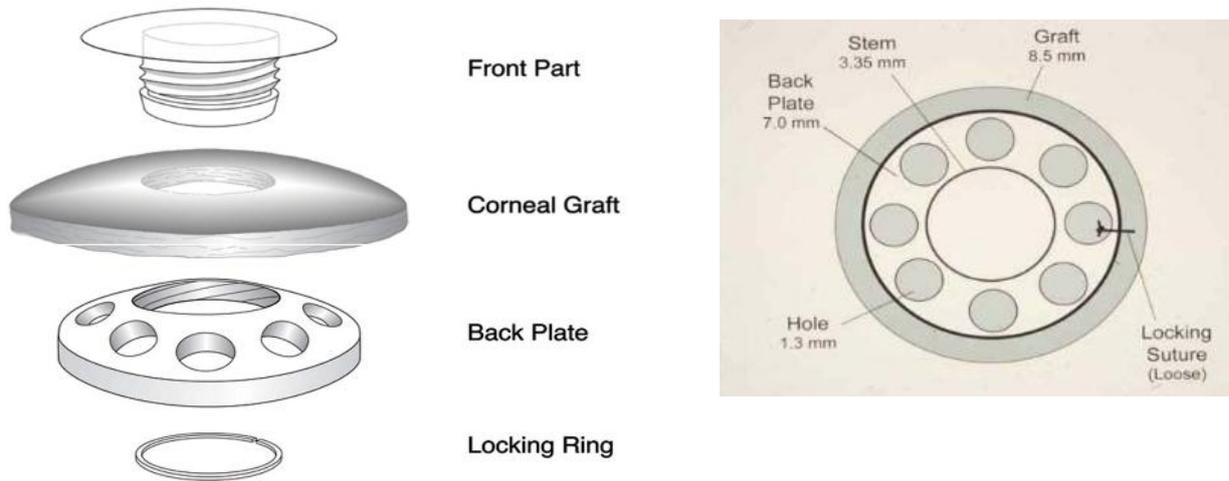


Figure 1-28 : Schéma de la Boston Kpro®

Il est devenu ensuite admis qu'il fallait que l'épithélium puisse se développer sur le système afin d'éviter les infections et extrusion (Sweeney *et al.*, 2003). Les matériaux alors utilisés (PMMA, PVA, pHEMA) pour les cornées artificielles ne permettant pas l'adhésion cellulaire, des améliorations ont été apportées pour optimiser la capacité des cellules épithéliales à adhérer et migrer sur la surface. C'est ainsi que du collagène, de la fibronectine, de la laminine ou des peptides tels que RGD, IKVAV ont été greffés à la surface des cornées artificielles (Kobayashi & Ikada, 1991; Merrett *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2005). La présence de ces protéines semble, *in vitro*, déclencher la sécrétion par les cellules de protéines de la MEC et la formation de complexes d'adhésion afin de créer une nouvelle membrane basale (Sweeney *et al.*, 2003). La porosité ainsi que la topographie influencent également la colonisation cellulaire.

Des études montrent que la croissance des cellules épithéliales et leur adhésion étaient fortement améliorées en attachant un peptide (FAP) à de la laminine ou à de la fibronectine grâce à des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) (Jacob *et al.*, 2005; Wallace *et al.*, 2005). Dans d'autres études, des dépôts à base de fibronectine RGD (Bruining *et al.*, 2002), de laminine YIGSR (Merrett *et al.*, 2001) et de peptide collagénique Gly-Pro-Nleu (Johnson *et al.*, 2000) ont aussi montré l'amélioration de l'adhésion des cellules épithéliales.

Une autre manière d'améliorer « l'épithélialisation » consiste à utiliser des facteurs de croissance en particulier l'EGF (epidermal growth factor) qui stimule fortement la prolifération et la migration des cellules épithéliales. Il est également présent dans le processus de cicatrisation. Il a été montré que l'EGF lié de façon covalente à un substrat de PDMS via du PEG améliore significativement la colonisation du polymère (Klenkler *et al.*, 2005). En outre les cellules sur les surfaces présentant de l'EGF produisent beaucoup plus de protéines de la MEC, nécessaires pour une bonne adhésion cellulaire. Le TGF β , en raison de sa capacité à inhiber la croissance des cellules épithéliales au profit de la prolifération des cellules stromales, a été également utilisé. Cependant les résultats obtenus *in vitro* furent opposés à ce qui était attendu. La croissance des

kératocytes était inhibée alors que les cellules épithéliales proliféraient à la surface. Ceci met en exergue la complexité des interactions cellules-facteurs de croissance (Merrett *et al.*, 2003). En 2001, Kim et collaborateurs publient une recherche montrant, à la fois *in vitro* et sur le lapin, la diminution de l'adhésion de kératocytes et de cellules inflammatoires à la surface d'un implant de PMMA sur lequel a été greffé du PEG (Kim *et al.*, 2001).

La perméabilité à l'oxygène et aux nutriments est également une nécessité pour assurer le succès des implantations des cornées artificielles. Une étude menée par Liu et Sheardown en 2005 a montré qu'un réseau interpénétré de PDMS et d'hydrogel présentait une perméabilité au glucose proche de celle que possède une cornée humaine normale (Liu & Sheardown, 2005).

En 2005, Jacob et collaborateurs ont couplé des peptides d'adhésion cellulaire et diverses cytokines à du pHEMA/MAA (Jacob *et al.*, 2005). Différents facteurs comme la fibronectine, la laminine, de l'IGF-1 ou le peptide RGD ont été utilisés afin de comparer leurs effets sur l'adhésion et la croissance des cellules épithéliales lorsqu'ils sont soit directement greffés sur la surface soit attachés via du PEG. Il a ainsi été montré que les molécules de PEG offraient un microenvironnement favorable pour les cellules épithéliales, celles-ci croissant jusqu'à la confluence, alors que très peu d'entre elles ont proliféré sur les surfaces où les facteurs étaient directement greffés.

En 2008, Myung et collaborateurs développèrent une cornée artificielle comprenant un double réseau de PEG et de PAA (poly(acrylic acid)) entouré par une ceinture de PHEA micro-perforée (Myung *et al.*, 2008). Couplé à du collagène de type I, ce système a permis une bonne couverture de la surface par les cellules épithéliales *in vitro* et sur le lapin (Myung *et al.*, 2009).

1.3.2 Matériaux basés sur l'auto assemblage par les cellules

Plusieurs groupes ont proposé des systèmes où la cornée artificielle est créée par les cellules elles-mêmes. Par exemple, Germain *et al.* (Germain *et al.* 1999) ont utilisé une technique d'auto-assemblage où les cellules stromales, qui reçoivent un apport en nutriments et en facteurs tels que l'acide ascorbique, produisent des feuilles de collagène associé à d'autres molécules de la MEC (Gaudreault *et al.*, 2003)

Les "feuilles" sont assemblées et des cellules épithéliales sont mises en culture sur la surface. La question de la culture de cellules endothéliales afin de former l'endothélium a été abordée par Gagnon et collaborateurs. (Gagnon *et al.*, 2005). En 2008, Carrier *et al.* ont proposé un stroma formé à partir de fibroblastes cornéens et dermiques dans le but d'obtenir un épithélium bien différencié (Carrier *et al.*, 2008). Il a fallu 4 semaines pour produire un assemblage de 36 μm d'épaisseur. Cet assemblage, avec plusieurs couches parallèles de cellules et leurs fibrilles de collagène de diamètre compris entre 27 et 51

nm (30 nm environ pour la cornée humaine en moyenne), était assez proche du stroma rencontré dans une cornée humaine (Guo *et al.*, 2007).

1.3.3 Utilisation de cellules souches

Il est possible de choisir une stratégie basée sur l'utilisation de cellules souches et les travaux sont relativement nombreux (par exemple Nishida *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2007). Parmi les travaux récents on peut donner en exemple ceux de Garzon *et al.* (Garzon *et al.*, 2014) qui utilisent les cellules souches dérivées de la gelée de Wharton (matrice extracellulaire du cordon ombilical). Ces cellules souches possèdent des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation qui justifient leur utilisation en thérapie allogénique et en ingénierie tissulaire, notamment pour le développement de substituts fonctionnels de la cornée humaine. Garzon *et al.* ont montré que c'est une stratégie novatrice qui se base sur les techniques de transdifférenciation des cellules souches mésenchymateuses. En effet, dans des conditions appropriées, ces cellules ont été capables de reproduire l'épithélium de la cornée humaine *in vitro*, avec des niveaux adéquats de différenciation dans le stroma de la cornée et de l'épithélium. Malgré ces résultats encourageants, ces études nécessitent encore d'être confirmées par des études au niveau fonctionnel, *ex vivo* et *in vivo*. Rappelons qu'en France, au terme de la loi de bioéthique d'août 2004, l'utilisation des cellules souches est réglementée. Le Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé a émis un avis sur l'utilisation des cellules souches issues de la gelée de Wharton (Avis n°117, 2012). Ce comité considère comme éthique "d'encourager les institutions de recherche à faire des appels à projets, dans le domaine de la recherche fondamentale".

1.3.4 Biomatériaux : matrice avec cellules

Dans la plupart des cas de blessure, seule une couche de la cornée est affectée. L'épithélium qui est exposé à l'environnement est plus sujet aux blessures liées, par exemple, à une brûlure chimique ou causée par la chaleur ou bien au syndrome de sécheresse oculaire. Les cellules souches et les progéniteurs qui entrent en jeu pour la réparation risquent d'être touchés et dans l'impossibilité de repeupler le stroma. Des cellules souches cornéennes peuvent être obtenues à partir d'explants provenant du limbe, d'une partie non endommagée de l'œil ou d'une source allogénique. Les explants sont le plus souvent mis en culture sur des membranes amniotiques humaines (Nakamura *et al.* 2006) ou sur des substrats de fibrine qui peuvent être autologues (Han *et al.* 2002). Les cellules qui s'y développent forment alors des feuillets qui peuvent être prélevés et transplantés sur l'œil endommagé. Des substrats de collagène recombinant (Dravida *et al.*, 2008) et de fibroïne de soie (Chirila *et al.*, 2008) ont aussi été utilisés pour la prolifération et la différenciation d'un épithélium à partir de cellules progénitrices.

Chez certains patients dont les cornées présentent une insuffisance en cellules souches limbiques, une reconstruction autologue de la surface de la cornée a été effectuée par la trans-différentiation de l'épithélium de la muqueuse buccale (Inatomi *et al.*, 2006). Ces cellules ont été cultivées sur des membranes amniotiques humaines puis transplantées sur 15 yeux de 12 patients avec des résultats encourageants. Les auteurs de l'étude ont suggéré que l'utilisation de précurseurs épithéliaux autologues transdifférenciés était plus sûre pour la re-épithélialisation de la surface oculaire qu'une greffe allogénique classique en particulier pour les patients les plus jeunes sévèrement touchés. Ils ont remarqué cependant la présence d'une vascularisation en périphérie de la cornée.

Des systèmes « multicouches » élaborés à partir de cornées animales ont été décrits par plusieurs groupes. Le premier exemple de ce type date de 1999. Griffith et ses collaborateurs développèrent un système qui comportait les trois couches cellulaires de la cornée : un hydrogel de collagène associé à du chondroïtine sulfate avec des cellules cornéennes immortalisées (Griffith *et al.*, 1999). Ce système était capable de répondre à un stimulus chimique par une modification de l'expression des gènes et/ou de la transparence. Le problème majeur de ce système était ses très faibles propriétés mécaniques. Plus récemment, l'utilisation de cornées bovines décellularisées pour y cultiver des cellules a semblé plus appropriée pour la reconstruction d'un équivalent cornéen multicouche (Ponce Marquez *et al.*, 2009).

1.3.5 Matériaux biomimétiques comme supports pour la régénération

La croissance 3D des cellules, ou encapsulation, n'a été obtenue que pour très peu de polymères synthétiques : l'oxyde de polyéthylène, l'oxyde de polypropylène et le poly(N-isopropylacrylamide) (PNiPAAm) (Lee & Money, 2001; Hoffman, 2002). A l'opposé, les hydrogels naturels faits à partir d'alginate, de chitosan, d'agarose, d'albumine ou de collagène sont très souvent utilisés à des fins d'encapsulation de cellules. Le collagène I est très intéressant pour l'élaboration d'une matrice "support" puisque, en plus d'être le composant majoritaire de la cornée, il possède de bonnes propriétés mécaniques ainsi qu'un motif arginine - glycine - acide glutamique permettant l'attachement cellulaire (Pierschbacher & Ruoslahti, 1987). A faible concentration en collagène, il faudra cependant le réticuler chimiquement (Hoffman, 2002) car ses propriétés mécaniques seront insuffisantes.

Un polymère de NiPAAm ou son analogue modifié avec le peptide YIGSR, co-polymérisé avec du collagène I de bovin a permis d'obtenir un hydrogel transparent pouvant être moulé en forme de cornée (Li *et al.*, 2003).

En outre, des hydrogels de collagène associé à du TERP5 ont été greffés sur des cochons nains. Le second œil de chacun des cochons n'était pas traité alors que des allogreffes servaient de contrôle. Cette étude a constitué le premier cas de croissance des cellules stromales et épithéliales dans l'implant pour recréer le tissu cornéen. La régénération

des cellules a aussi été constatée et la sensibilité au toucher des animaux traités retrouvée après 6 semaines. Les allogreffes de contrôle n'ont pas permis de restaurer les cellules nerveuses et donc la sensibilité après 6 semaines. Duan et Sheardow montrèrent qu'en remplaçant le TERP par des dendrimères multifonctionnels, les propriétés mécaniques étaient améliorées. Autre avantage, l'utilisation de ces dendrimères permet d'ajouter différents groupes fonctionnels d'intérêt biologique sur les hydrogels (Duan & Sheardow, 2005, 2006).

Liu *et al.* en 2009 ont mis en place une cornée artificielle à partir de collagène et d'un lipide synthétique appelé phosphorylcholine (Liu *et al.*, 2009). Dans ce système, il y avait un réseau de collagène réticulé avec du 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide et du N-hydroxysuccinimide. Un second réseau comprenait du polyéthylène glycol diacrylate réticulé avec du 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC). L'hydrogel obtenu possédait de bonnes propriétés mécaniques et une meilleure résistance à la digestion enzymatique par la collagenase. Malgré les faibles propriétés d'adhésion cellulaire du MPC, ces hydrogels ont favorisé la croissance des cellules cornéennes et des cellules nerveuses aussi bien avec le modèle animal sain qu'avec les animaux présentant une cornée endommagée (brûlure chimique). En outre ces hydrogels présentaient non seulement des propriétés optiques adéquates, mais aussi une bonne perméabilité au glucose et à l'albumine (Liu *et al.*, 2009). En 2010 McLaughlin et collaborateurs ont réalisé un implant de collagène-MPC dans toute l'épaisseur cornéenne de cochons d'inde. La régénération nerveuse a été obtenue dans les 8 mois suivant l'opération et le tissu cornéen reconstruit grâce à la croissance des cellules dans l'implant (McLaughlin *et al.*, 2010).

A ce jour, seules des cornées artificielles de collagène III humain recombiné et réticulé avec de l'EDC ou du NHS ont été testées sur l'humain. En Suède, une étude de greffe lamellaire a été menée sur 10 patients. Après 24 mois, il y avait eu régénération de l'épithélium et croissance dans l'implant des cellules stromales. Une croissance partielle des nerfs a également été constatée (Fagerholm *et al.*, 2010)

Torbet *et al.* (2007) ont également mis au point un scaffold avec des lamelles orthogonales de collagène aligné et orienté magnétiquement.

Tanaka *et al.* ont également réussi à obtenir une cornée artificielle stratifiée avec, comme principal composant, du collagène I (Figure 1-29). Les différentes lamelles (2 à 5 µm d'épaisseur) assemblées sont obtenues par du "flow-casting" orienté (Tanaka *et al.*, 2010). Ainsi, les fibrilles d'une lamelle vont dans une direction perpendiculaire à celles de la lamelle adjacente. L'ensemble possède une bonne transparence grâce à plusieurs cycles de vitrification et de réticulation avec de l'EDC et du NHS (Figure 1-30). Ce système permet également d'avoir des propriétés mécaniques supérieures à la cornée humaine.

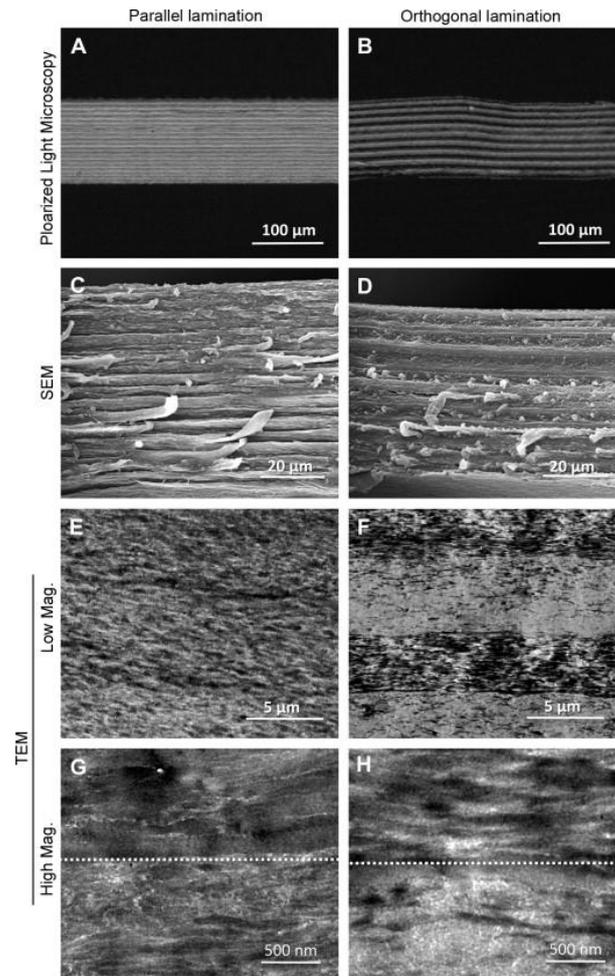


Figure 1-29 : Caractérisation structurale de 20 couches de collagène après un traitement de clarification optique. Coupes des couches stratifiées de collagène avec les directions parallèles (A, C, E, et G) et perpendiculaires (B, D, F et H). A et B : image en lumière polarisée de coupes gelées. C et D : imagerie SEM. E et F : images TEM à faible grandissement. G et H images TEM à fort grandissement (figure tirée de Tanaka *et al.*, 2010).

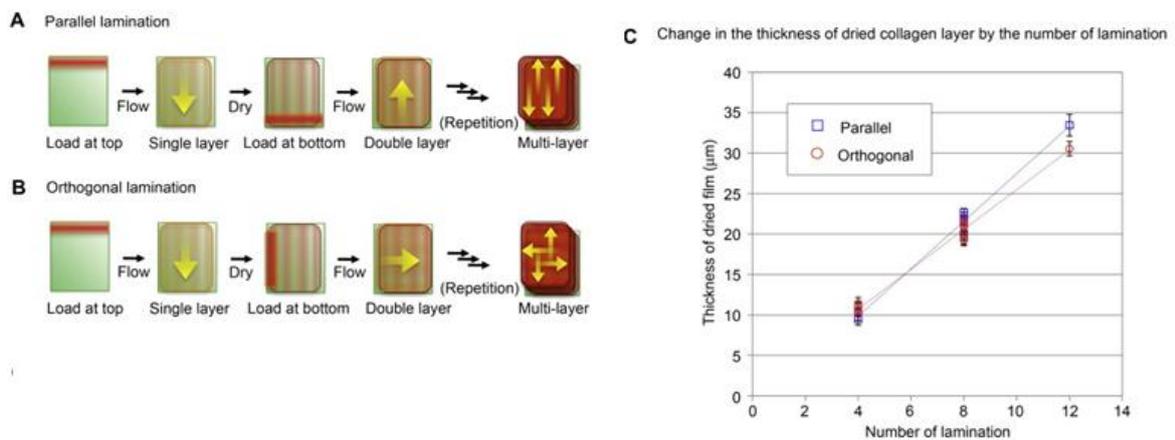


Figure 1-30 : A et B : schéma expliquant la formation des couches de fibrilles orientées par flow-casting. (A : laminage parallèle, B : laminage orthogonal). C : la taille est contrôlée par le nombre de couches ajoutées. (Tanaka *et al.*, 2010)

Le procédé de fabrication de cornées artificielles à partir de collagène développé par Calderon-Colon *et al.* comporte principalement trois étapes : une gélification suivie d'une vitrification puis une réhydratation. Ils obtiennent une transparence de 85% et un module d'Young de 12MPa (Calderon-Colon *et al.*, 2012). Les molécules de collagène réticulent pendant la vitrification durant un processus d'auto-assemblage illustré par la Figure 1-31.

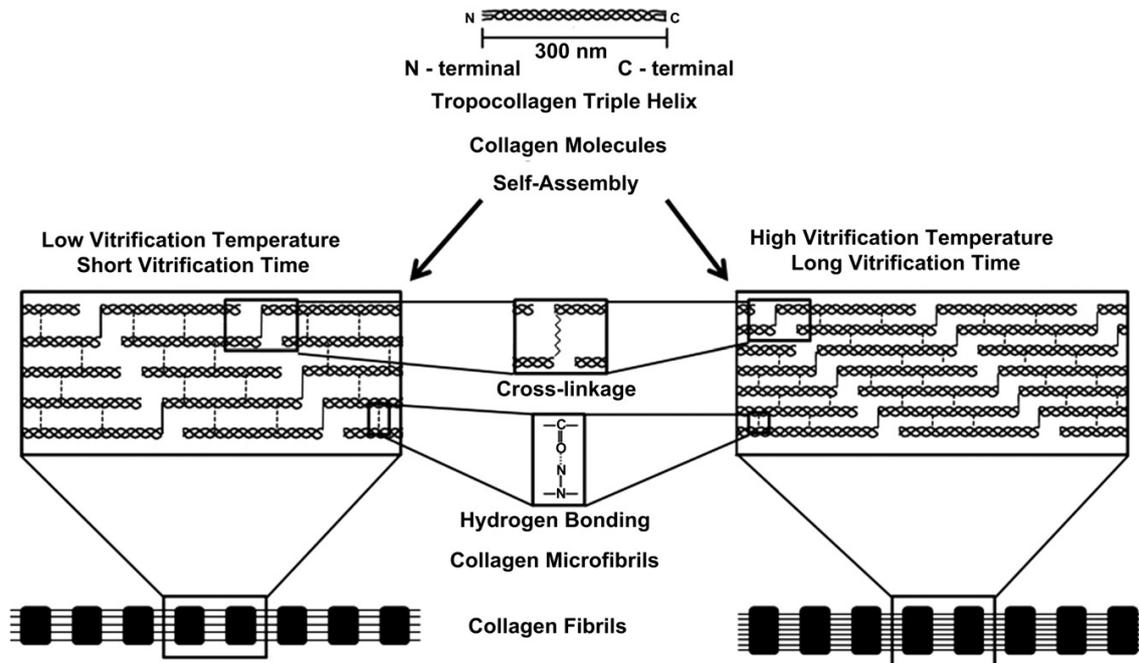


Figure 1-31 : Réticulation du collagène durant la vitrification. On voit l'impact du temps de vitrification sur la microstructure. (Calderon-Colon *et al.*, 2012)

Les paramètres de synthèse ont une grande influence sur la structure du système et la densité des fibrilles. Concernant la transparence, le paramètre déterminant est la taille des fibrilles et l'homogénéité du matériau (homogénéité dans le diamètre des fibrilles et dans l'interdistance) ainsi que la quantité d'eau. Le temps de vitrification est un paramètre important car plus il est grand, plus le matériau obtenu est transparent. Cela est sans doute dû au fait que l'espace inter-fibrillaire devient plus régulier et plus proche de celui de la cornée. Une autre possibilité est que l'indice de réfraction des fibrilles devienne plus proche de celui de l'eau. Dans ce système les matériaux les plus transparents sont ceux avec les fibrilles dont le diamètre moyen est le plus grand, soulignant ainsi l'importance de l'homogénéité ou la correspondance des indices de réfraction. La température de vitrification est également importante. Une température plus élevée entraîne une accélération de la réticulation et donc un matériau plus dense.

Plus récemment, une cornée artificielle obtenue à partir d'écaillés de poisson (*Tilapia*) a été proposée comme support à la régénération du tissu cornéen (van Essen *et al.*, 2016). Les écaillés, composées de collagène de type I et organisées d'une manière semblable à la cornée (Okuda *et al.*, 2007), sont décellularisées, décalcifiées et passées sous irradiation

gamma. Les matrices alors obtenues faisaient environ 1 mm de diamètre pour 0,25-0,5 mm d'épaisseur. Les résultats obtenus ont montré la bonne adhésion et la bonne prolifération des cellules épithéliales à la surface ainsi que la biocompatibilité des matrices (Figure 1-32). Les cellules expriment également le bon phénotype.

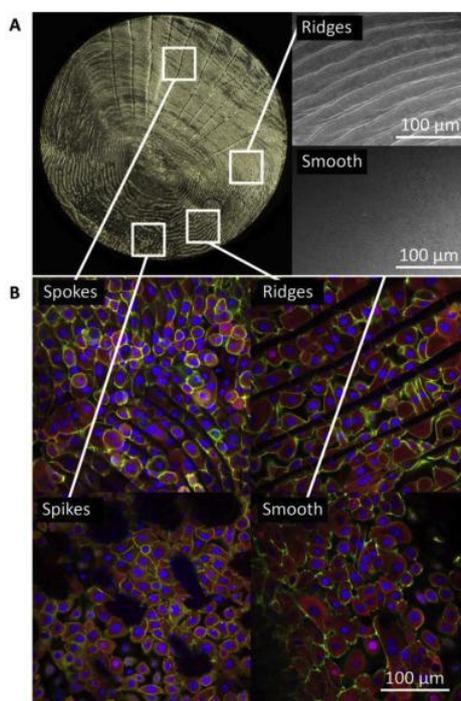


Figure 1-32 : Prolifération des cellules épithéliales des deux côtés de l'écaille, (van Hessen et al., 2016).

En outre les essais menés *in vivo* sur des lapins se sont avérés plutôt concluants malgré la présence de quelques scarifications à proximité de l'implant. L'implant s'est révélé stable et n'a pas engendré de réponse immunitaire mais l'auteure ne précise pas sur quelle durée.

1.4 Conclusion

Nous avons vu une large gamme des différentes approches existantes et qui sont toutes prometteuses. Ce peut être un biomatériau couplé ou non à des cellules souches voire des cellules souches seules, pour remplacer ou recréer le tissu endommagé sur une partie ou dans toute l'épaisseur. L'approche développée dans cette thèse consiste à créer un matériau le plus biomimétique possible à partir du collagène de type I, celui-ci étant le composant majoritaire dans le stroma cornéen et, de plus, non immunogène. Ainsi, nous n'incluons pas de polymères synthétiques dans la fabrication. En outre, les propriétés cristal-liquide du collagène doivent permettre de créer des matrices transparentes organisées d'une façon similaire au stroma, grâce à la conservation de l'organisation lors de la fibrillogenèse, et sur lesquelles l'épithélium cornéen peut être reformé à partir des cellules souches limbiques.

CHAPITRE 2
MATERIAUX ET METHODES DE
CARACTERISATION

2 Matériaux et méthodes

2.1 Obtention des solutions de collagène

Les paragraphes suivants décrivent comment sont obtenues les solutions de collagène servant à l'élaboration des cornées artificielles.

2.1.1 Extraction du collagène

Le collagène de type I utilisé provient de tendons de queues de rats. Une fois extraits, les tendons sont immergés dans une solution de PBS 1x (pH 7,4) sous agitation, puis les résidus de vaisseaux sanguins les plus visibles sont éliminés à la main. S'ensuivent alors plusieurs centrifugations afin d'éliminer les divers contaminants passés dans la solution de PBS lors de l'extraction. Celles-ci ne sont arrêtées que lorsque le surnageant est limpide. Des centrifugations dans du NaCl 4M provoquent un choc osmotique qui lyse les cellules restantes et fait précipiter des protéines de haut poids moléculaire. Pour éliminer le sel et autres résidus les tendons sont une nouvelle fois centrifugés dans du PBS 1x avec un lavage final dans de l'eau Milli-Q. Les tendons sont alors dissous dans de l'acide acétique 500 mM jusqu'à obtention d'une solution visqueuse de collagène I mélangé à d'autres biomolécules contaminantes. Pour purifier la solution et éliminer une partie de ces protéines contaminantes, nous induisons une première précipitation à une concentration en NaCl de 300 mM. Le tout est centrifugé à 21 000 rpm (tour.mn^{-1}) (53343 g) pendant 3h à 10°C et le surnageant est récupéré. Nous induisons la précipitation sélective du collagène I en faisant monter la concentration en NaCl à 600 mM. La solution est centrifugée pendant 1 h à 4500 rpm (4922 g). Les culots sont récupérés puis solubilisés dans de l'acide acétique 500 mM. Afin d'éliminer le sel, plusieurs dialyses contre des solutions d'acide acétique 500 mM sont effectuées. Finalement, les derniers résidus et agrégats sont éliminés avec une centrifugation de 3h à 22 000 tour.mn^{-1} . La solution obtenue est gardée dans des tubes stériles à 4°C et a généralement une concentration en collagène proche de 3 mg/mL. Cette concentration peut être déterminée précisément par dosage d'hydroxyproline.

2.1.2 Dosage de la solution de collagène

Le dosage du collagène correspond en réalité à la détermination de la concentration en hydroxyproline. Pour ce faire, un volume de 50 μL de solution collagène est mélangé à un

même volume d'acide chlorhydrique 37 % afin de libérer les hydroxyprolines. Le tout est placé dans une étuve à 106°C pour une nuit afin d'obtenir l'hydrolyse du collagène. Ensuite on procède à l'évaporation du mélange et le résidu obtenu est remis en solution dans 1 mL d'eau. Ce mélange est dilué avec de l'eau pour obtenir trois échantillons de 400 µL de différentes concentrations (1/40, 1/20, 1/10). Dans chacun de ces échantillons un volume de 200 µL de Chloramine-T, d'acide perchlorique et de DMBA (4 diméthylamino-benzaldehyde) est ajouté de sorte à provoquer une réaction qui va donner à chaque échantillon une couleur entre le jaune et le rouge relative à la quantité d'hydroxyproline présente. Enfin, l'absorption à 557 nm est mesurée pour chaque échantillon. Une courbe référence est obtenue pour une solution d'hydroxyproline dont la concentration est connue et égale à 20 µg/mL. Cette courbe permet de corréliser la concentration d'hydroxyproline à l'absorption. En tenant compte de la dilution de chaque échantillon et sachant que la molécule de collagène de type I contient 13% d'hydroxyproline (hp), la concentration en collagène est calculée comme suit :

$$c(\text{collagène}) = 7,6 \cdot D \cdot c(\text{hp}) ,$$

où D est le facteur de dilution.

2.1.3 Pureté de la solution de collagène

La pureté de la solution est déterminée par une électrophorèse en conditions dénaturantes sur gels de polyacrylamide. Cela permet d'identifier les protéines présentes par leur poids moléculaire.

Préparation des gels de polyacrylamide

Il y a deux types de gels: un gel de concentration et un gel de migration. C'est la quantité de polyacrylamide qui définit la taille des pores dans le gel. Un gel de concentration à 4% en polyacrylamide et un gel de migration à 6% permettent de bien séparer les différentes chaînes polypeptidiques du collagène. Les gels contiennent également de l'ammonium persulfate et du TEMED car le premier induit la polymérisation et le second l'accélère. Les deux gels sont coulés l'un après l'autre entre deux plaques de verre maintenues verticalement, le premier coulé étant le gel de migration. La composition exacte des différents gels est donnée en Annexe 1.

Préparation des échantillons

Les échantillons ont un volume de 20 µL et correspondent à un mélange de 10 µL d'une solution de collagène plus ou moins diluée avec 10 µL de tampon d'échantillon. Trois dilutions différentes sont utilisées: une dilution 2,5, 5 et 10. Le tampon d'échantillon contient du SDS ce qui permet de dénaturer la molécule de collagène. Pour ce faire le mélange est chauffé durant 5 minutes à 100°C dans de l'eau bouillante. Ensuite on refroidit le tout pendant 5 minutes dans de la glace et les échantillons sont placés dans les puits du gel de concentration au côté d'un puits dans lequel est mis le marqueur de

poids moléculaire (SDS-6H, SIGMA). Le marqueur de poids moléculaire est introduit dans un des puits de sorte à pouvoir relier la distance de migration des molécules présentes dans la solution de collagène à un poids moléculaire.

Migration

L'ensemble du système (gels + échantillons) est immergé dans un tampon de migration et une différence de potentiel est appliquée entre la base du gel de migration et le sommet du gel de concentration. Tant que les échantillons sont dans le gel de concentration, la tension appliquée est de 80 V. Une fois dans le gel de migration, la tension est fixée à 120 V. Un gel issu d'une des purifications effectuées est présenté Figure 2-1.

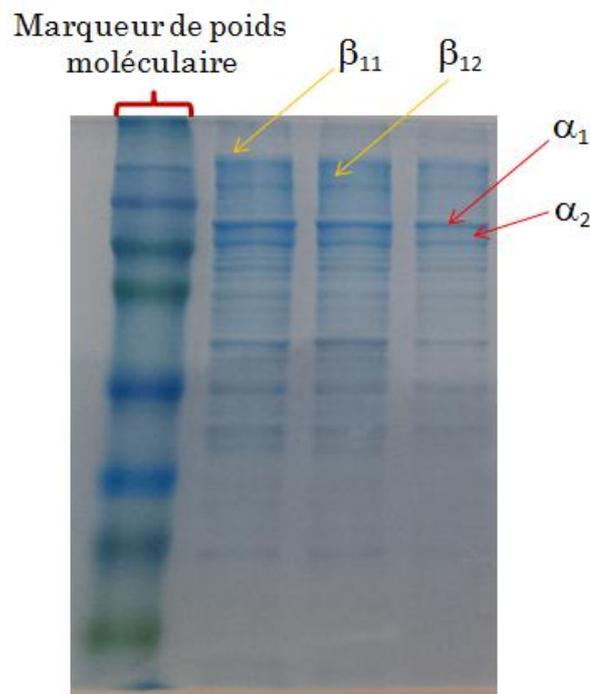


Figure 2-1 : Gel d'électrophorèse en condition dénaturante. Les bandes les plus marquées sont caractéristiques du collagène. Les deux bandes du haut correspondent aux dimères β_{11} et β_{12} et les deux bandes les plus importantes aux brins α_1 et α_2 . Concentrations décroissantes de gauche à droite.

Fixation et coloration

Pour fixer les protéines et les colorer, le gel est placé pendant 1 heure dans une solution de bleu de Comassie. Ensuite, afin de retirer l'excédant de Bleu de Comassie, le gel coloré est placé dans divers bains de décoloration contenant de l'eau, de l'éthanol et de l'acide acétique.

2.1.4 Ajustement de la condition physico-chimique

La condition physico-chimique est définie par les concentrations en acide acétique et en acide chlorhydrique de la solution de collagène. Chaque condition est nommée par un numéro (voir Tableau 2-1). Les différentes concentrations sont ajustées par dialyses en utilisant une membrane de 12-14 kDa (Spectra Pore 12-14 000; 6,4 mL/cm). Au total, 28 conditions physico-chimiques ont été étudiées. Elles sont listées dans le Tableau 2-1 et la Figure 2-2. Le pH correspond au pH du mélange des deux acides.

| Condition | c(AA) | c(HCl) | pH |
|-----------|-------|--------|------|
| 1 | 70 | 1,25 | 2,55 |
| 2 | 120 | 0,3 | 2,85 |
| 3 | 220 | 0,3 | 2,61 |
| 4 | 320 | 0,3 | 2,57 |
| 5 | 36 | 0,6 | 2,91 |
| 6 | 36 | 0,9 | 2,85 |
| 7 | 36 | 1,25 | 2,78 |
| 8 | 220 | 0,9 | 2,59 |
| 9 | 220 | 0,6 | 2,58 |
| 10 | 120 | 0,6 | 2,73 |
| 11 | 200 | 0 | 2,77 |
| 12 | 300 | 0 | 2,70 |
| 13 | 200 | 1,25 | 2,64 |
| 14 | 300 | 1,25 | 2,58 |
| 15 | 500 | 1,25 | 2,44 |
| 16 | 800 | 1,25 | 2,39 |
| 17 | 36 | 1,5 | 2,70 |
| 18 | 120 | 1,5 | 2,54 |
| 19 | 220 | 1,5 | 2,63 |
| 20 | 36 | 0,3 | 2,93 |
| 21 | 120 | 1,25 | 2,71 |
| 22 | 5 | 0,3 | 3,37 |
| 23 | 10 | 0,3 | 3,26 |
| 24 | 20 | 0,3 | 3,17 |
| 25 | 2 | 0,3 | 3,45 |
| 26 | 0 | 0,3 | 3,60 |
| 27 | 5 | 0 | 3,42 |
| 28 | 10 | 0 | 3,31 |

Tableau 2-1 : Conditions expérimentales. Ensemble des conditions physico-chimiques testées. Les concentrations des acides sont en mM. Le pH indiqué est celui des solutions de dialyse c'est-à-dire les solutions contre lesquelles la solution de base obtenue après purification est dialysée.

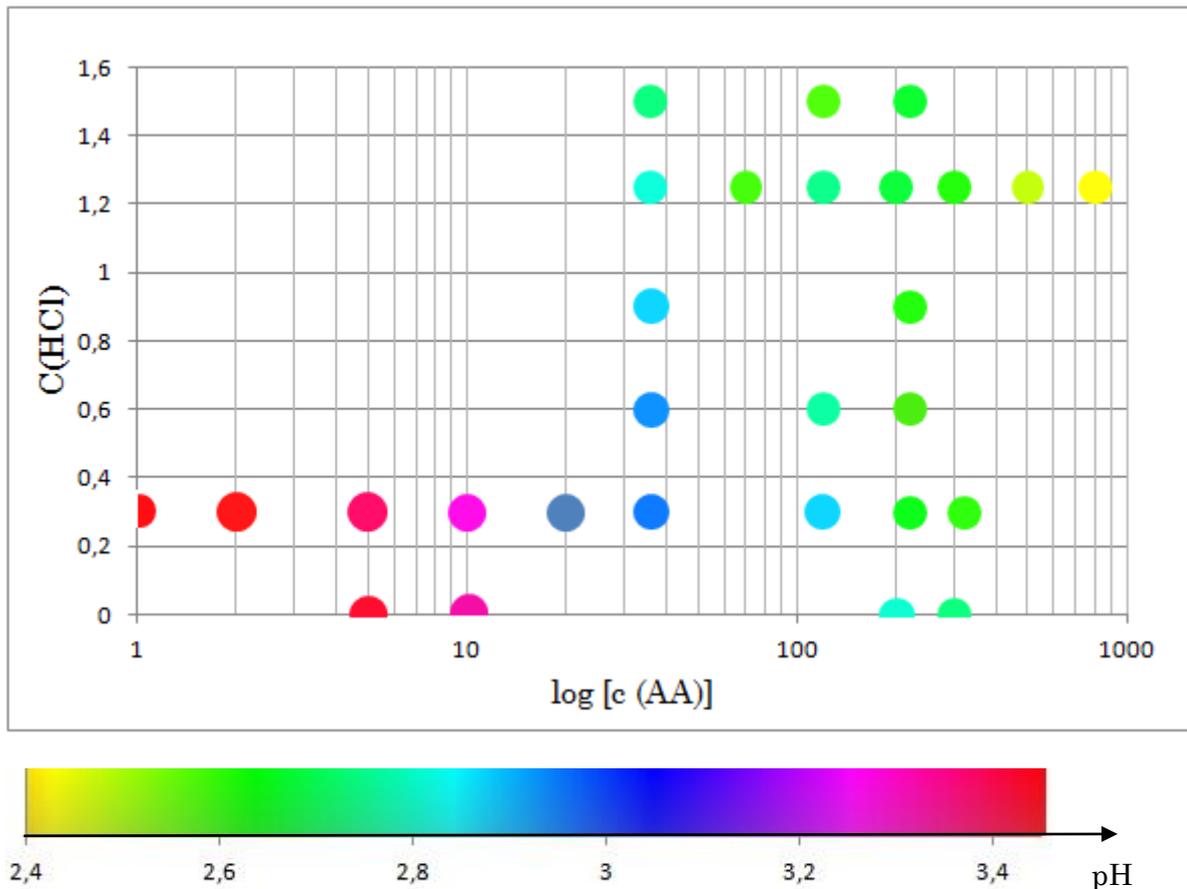


Figure 2-2 : Cartographie des conditions physico-chimiques testées.

En général, six bains sont effectués pour être certain que la solution à l'intérieur du sac de dialyse ait atteint la condition souhaitée.

2.2 Concentration du collagène

La concentration des solutions de collagène est un paramètre clef. En fonction de l'objectif, la technique de concentration est différente. En concentrant les solutions de collagène, on peut former des matrices denses et organisées. Il est possible de concentrer les solutions dans un système appelé microcellule qui permet d'étudier les phases cristal-liquides formées par chacune des solutions dans leur condition physico-chimique. Ceci permet de déterminer, grâce à la microscopie à lumière polarisée et à la génération de second harmonique, la phase cristal-liquide (et donc la condition physico-chimique) qu'il faudra stabiliser pour former une cornée artificielle (voir paragraphe 2.3).

2.2.1 Pour la fabrication des matrices denses de collagène fibrillé

Les solutions de collagène destinées à la synthèse de matrices denses fibrillées sont concentrées par centrifugation-filtration en utilisant des concentrateurs d'échantillons

(VIVASPIN avec un cut-off de 100 kD). Les tubes VIVASPIN sont centrifugés et le solvant passe à travers le filtre alors que le collagène reste dans la partie supérieure du tube et s'y concentre donc. La centrifugation (Beckman Coulter J26-XP, 4500 rpm, 10°C) dure jusqu'à ce que la concentration souhaitée soit atteinte. On vérifie la justesse de la concentration en procédant à une pesée. Les solutions concentrées sont ensuite placées dans des seringues stériles que l'on centrifuge également afin d'éliminer les bulles d'air. Elles sont ensuite stockées à 4°C. Les solutions peuvent être moulées soit sous forme de disque soit sous forme de cornée et soumises aux vapeurs d'ammoniaque afin de provoquer leur fibrillogenèse. Pour ce faire, les solutions concentrées de collagènes moulées sont placées dans un dessiccateur d'environ 2L en présence d'une solution aqueuse d'ammoniaque (14M, 2mL).



Figure 2-3 (a) moule en verre respectant la courbure de la cornée; (b) cornée moulée en forme de disque, classiquement utilisée pour les mesures de transparence et la culture cellulaire.

2.2.2 Pour l'étude des phases cristal-liquides en lumière polarisée

Les phases cristal-liquides obtenues pour chaque condition physico-chimique sont observées à travers un système appelé micro-cellule (Figure 2-4) développé par Mosser *et al.* (2005).

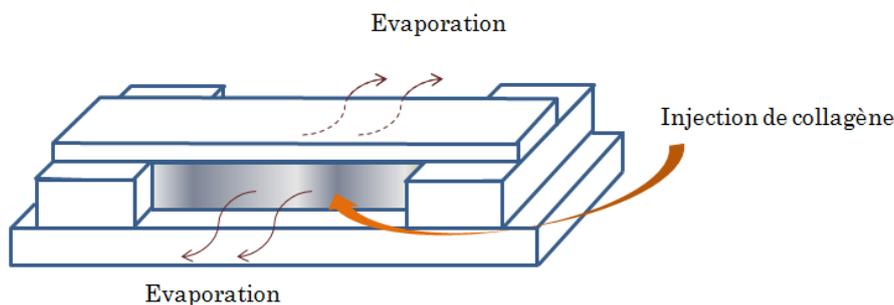


Figure 2-4 : Représentation schématique d'une micro-cellule. Le collagène est injecté continuellement à travers un capillaire pendant plusieurs jours. La solution se concentre à l'interface avec l'air par évaporation du solvant. On observe alors la formation des phases cristal-liquides dont l'organisation diffère suivant les conditions physico-chimiques.

Ce système, représenté schématiquement ci-dessus, consiste à injecter continuellement avec un pousse-seringue dont la vitesse d'injection est contrôlée, la solution de collagène

entre deux lamelles de verre. L'injection contrecarre l'évaporation. Un gradient de concentration s'établit entre le centre de la microcellule (zone la moins concentrée) et les bords à l'interface avec l'air (zones les plus concentrées). C'est à ce niveau que l'on va pouvoir observer la formation de la phase cristal-liquide sous lumière polarisée grâce à la biréfringence du collagène. En fonction des conditions physico-chimiques, donc des concentrations respectives des deux acides en présence, les phases cristal-liquides se forment plus ou moins rapidement. Après fibrillogenèse par vapeurs d'ammoniaque, on peut retirer l'échantillon fibrillé de la micro-cellule et l'observer au microscope électronique à transmission après préparation pour l'observation. Les microcellules ont toutes les mêmes dimensions : 2 cm de longueur pour 0,5 cm de large et 0,3 mm de hauteur.

2.3 Techniques de caractérisation de la microstructure

Deux grandes catégories de techniques de caractérisation ont été utilisées : les techniques mettant en jeu un rayonnement photonique et celles impliquant un rayonnement électronique. La première catégorie a permis notamment de caractériser les phases cristal-liquides obtenues en fonction des différentes conditions physico-chimiques et de déterminer précisément la plus avantageuse pour le projet. Les techniques de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence la microstructure des matrices, de vérifier l'organisation des matrices à cette échelle, de mesurer le diamètre des fibrilles et vérifier leur intégrité, ainsi que la qualité de l'adhésion cellulaire.

En sus de ces techniques, on a également caractérisé nos matériaux d'un point de vue mécanique.

2.3.1 Techniques classiques utilisant les rayonnements photoniques

2.3.1.1 *Mesure de la transparence des matrices fibrillées*

Afin de déterminer la transparence des matrices, des fines bandes de 500 μm d'épaisseur et de 3 mm de large sont découpées et placées dans des cuvettes (Make[®]) remplies d'eau Milli-Q. Une cuvette uniquement remplie d'eau sert de référence. Les mesures sont effectuées avec un spectrophotomètre UVIKON XL. A partir de l'absorbance mesurée pour la référence et l'ensemble (collagène + eau), on obtient l'absorbance de l'échantillon par la formule :

$$A_{\text{échantillon}}(\lambda) = A_{\text{mesurée}}(\lambda) - A_{\text{eau}}(\lambda) \quad \text{Équation 2-1}$$

En tenant compte de l'épaisseur d de l'échantillon (en mètre), la densité optique monochromatique de l'échantillon est donnée par :

$$D(\lambda) = \frac{A_{\text{échantillon}}(\lambda)}{d} \quad \text{Équation 2-2}$$

La densité optique moyenne est alors définie par la moyenne des $D(\lambda)$ pour λ compris entre 380 nm et 780 nm. Finalement, la transparence d'un échantillon est calculée en utilisant la relation suivante : $T = 10^{-D_m \cdot d}$

Les mesures de transparence ont été faites tous les deux jours du premier au vingtième jour. Par la suite, les mesures ont été effectuées environ 2 semaines après la synthèse des matrices afin que leur maturation soit suffisante.

2.3.1.2 Microscopie à lumière polarisée

Lumière naturelle. Une onde lumineuse est une onde électromagnétique, c'est-à-dire composée d'un champ électrique \vec{E} et d'un champ magnétique \vec{B} . Ces champs sont perpendiculaires entre eux et se situent dans un plan perpendiculaire à la direction de propagation : le plan d'onde. La direction de \vec{E} caractérise la polarisation d'une onde. Dans la lumière naturelle, le vecteur \vec{E} varie de façon aléatoire au cours du temps. Elle n'est donc pas polarisée.

Polarisation rectiligne. Lorsque la direction de \vec{E} reste constante dans le plan d'onde, la polarisation est dite rectiligne. En munissant le plan d'onde d'un repère Oxy , le vecteur \vec{E} s'écrit :

$$\vec{E} = E_x \vec{e}_x + E_y \vec{e}_y \quad \text{Équation 2-3}$$

Soit α l'angle entre \vec{E} et l'axe Ox . En $z = 0$, on a alors :

$$\begin{cases} E_x = E_0 \cdot \cos\alpha \cdot \cos\omega t \\ E_y = E_0 \cdot \sin\alpha \cdot \cos\omega t \end{cases} \quad \text{Équation 2-4}$$

Polarisation elliptique

On parle de polarisation elliptique quand l'extrémité du vecteur \vec{E} décrit une ellipse dans le plan d'onde. Soient a et b les demi-axes de l'ellipse, l'ellipticité est alors définie par : $\tan\psi = \frac{b}{a}$.

L'ellipse est dite droite si l'extrémité de \vec{E} tourne dans le sens horaire et gauche si elle tourne dans le sens trigonométrique.

Les équations horaires des composantes sont alors :

$$\begin{cases} E_x = a \cdot \cos\omega t \\ E_y = \varepsilon \cdot b \cdot \sin\omega t \end{cases} \quad \text{Équation 2-5}$$

avec $\varepsilon = \pm 1$.

Si le grand axe de l'ellipse OX fait un angle α avec l'axe Ox on a :

$$\begin{cases} E_x = a \cdot \cos\alpha \cdot \cos\omega t - \varepsilon \cdot b \cdot \sin\alpha \cdot \sin\omega t \\ E_y = a \cdot \sin\alpha \cdot \cos\omega t + \varepsilon \cdot b \cdot \cos\alpha \cdot \sin\omega t \end{cases} \quad \text{Équation 2-6}$$

Polarisation circulaire. La polarisation circulaire est un cas particulier de la polarisation elliptique. On l'obtient quand $a=b$, on a donc :

$$\begin{cases} E_x = a \cdot \cos\omega t \\ E_y = \varepsilon \cdot a \cdot \sin\omega t \end{cases} \quad \text{Équation 2-7}$$

La microscopie à lumière polarisée permet de visualiser les différentes phases cristal-liquides formées par les différentes conditions physico-chimiques lorsqu'elles sont concentrées dans les microcellules. La source de contraste est la biréfringence du collagène. Le microscope utilisé est un Nikon Eclipse E600L avec une caméra digitale DXM 1200 CCD. Pour visualiser les phases cristal-liquides, les microcellules étaient placées horizontalement entre polariseurs croisés. Entre ces polariseurs, une solution isotrope de collagène apparaît noire alors qu'une solution organisée anisotrope de collagène est colorée et texturée. Ceci est dû à la biréfringence du collagène. La biréfringence est la capacité d'un matériau cristallin anisotrope (le spath d'Islande par exemple) à diviser la lumière incidente en deux rayons séparés de polarisations croisées. Avec le collagène organisé en phase cristal-liquide, on rencontre le même phénomène : la lumière en le traversant est dédoublée en un faisceau appelé ordinaire et un autre dit extraordinaire qui ne suit pas les lois de Descartes. Cette double réfraction est liée au fait que, dans la phase cristal-liquide ou dans le cristal, il y a une direction particulière que l'on appelle axe de biréfringence où l'indice de la direction ordinaire (généralement appelé n_o) diffère de l'indice dans les directions perpendiculaires (appelé indice extraordinaire et noté n_e). Ces indices dépendent de la longueur d'onde λ de la lumière. La biréfringence d'un corps peut être quantifiée par la valeur : $\Delta n = n_e - n_o$.

Les milieux biréfringents étant optiquement anisotropes, la vitesse de l'onde lumineuse va varier avec la direction considérée du rayon. Quand les polariseurs sont croisés, c'est-à-dire à 90° , les rayons provenant du premier polariseur sont absorbés par le second, d'où l'extinction de la lumière. Ceci ne change pas si un corps isotrope est placé entre les deux polariseurs. La lumière se propageant dans un corps anisotrope peut être décomposée en deux composantes suivant les axes de l'ellipsoïde des indices (Figure 2-5).

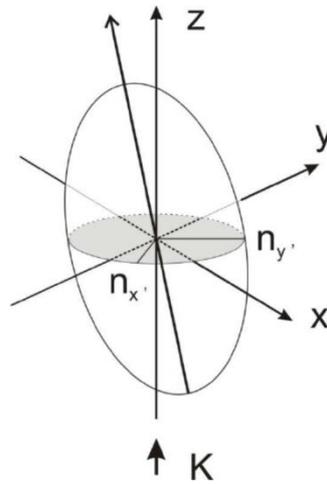


Figure 2-5 : Ellipsoïde des indices

En présence d'un tel corps, la lumière a une intensité I' qui s'écrit :

$$I' = I \sin^2(2\alpha) \sin^2\left(\frac{\pi\delta}{\lambda}\right) \quad \text{Équation 2-8}$$

où I' est l'intensité lumineuse à la sortie de l'analyseur (orienté à 90°), I l'intensité à la sortie du polariseur et α l'angle formé entre le polariseur et le plus grand axe de l'ellipsoïde des indices c'est-à-dire n_e (indice extraordinaire), δ le retard de phase de la composante vibrationnelle parallèle au polariseur par rapport à la composante parallèle à l'analyseur qui dépend du corps observé. Enfin λ est la longueur d'onde de la lumière.

Ainsi, les variations d'intensité observées en un même point dépendent uniquement de l'angle α c'est-à-dire de l'orientation de l'ellipsoïde des indices par rapport à l'axe du polariseur. L'intensité maximale sera obtenue pour des valeurs de α telles que : $\sin^2(2\alpha) = 1$ c'est-à-dire $\alpha = \pm \pi/4$.

De la même façon, l'intensité sera nulle pour : $\sin^2(2\alpha) = 0$ soit pour $\alpha = 0$ ou $\alpha = \pi/2$.

Quand un corps anisotrope tel qu'une phase cristal-liquide est observée au microscope à lumière polarisée, la rotation de la platine sur laquelle repose l'échantillon, fait varier l'angle α .

Ainsi la biréfringence est positive lorsque la vitesse de propagation de la lumière est plus rapide suivant l'axe ordinaire de l'ellipsoïde.

La Figure 2-6 donne un exemple d'image obtenue en lumière polarisée :

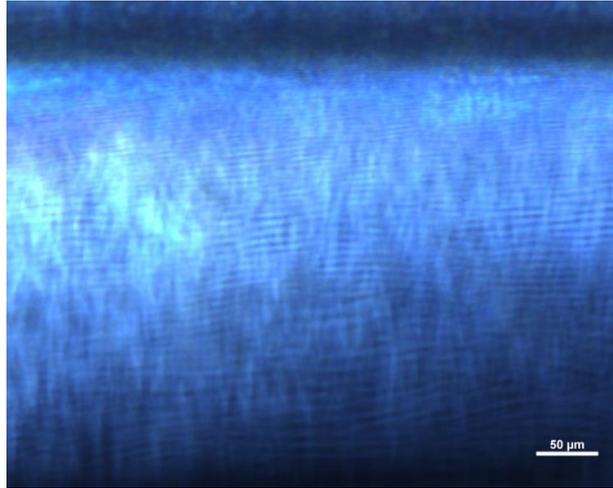


Figure 2-6 : Exemple de phase cristal-liquide formée dans une microcellule et observée au microscope à lumière polarisée. Cette phase est obtenue avec la condition 23. Elle est dite en contreplaqué puisque l'alternance de bandes brillantes et sombres signifie la présence d'angles importants (proche de 90°) entre deux couches de molécules.

2.3.1.3 Tomographie par cohérence optique

Basée sur des méthodes interférométriques à faible cohérence en lumière infrarouge, la tomographie par cohérence optique (OCT : Optical Coherence Tomography) permet une visualisation 3D des échantillons sans préparation particulière et offre une bonne résolution axiale (de l'ordre du μm). Cette technique est utilisée pour étudier la cornée (Feng & Simpson, 2005; Latour *et al.*, 2010) et nous l'avons appliquée pour observer nos matrices (avec cellules) et en déterminer l'épaisseur.

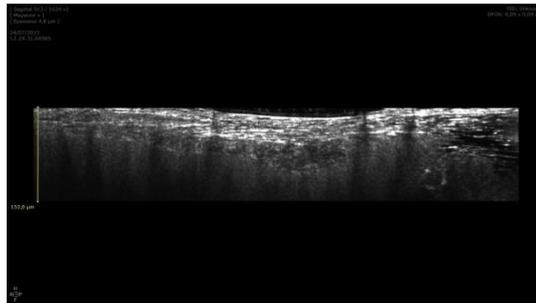


Figure 2-7 : Image OCT d'une matrice avec cellules stromales intégrées. On peut voir une image de la matrice dans toute son épaisseur.

2.3.2 Génération de seconde harmonique

Cette technique d'imagerie est très utile pour étudier les phases cristal-liquides car elle présente une bien meilleure résolution axiale que la microscopie à lumière polarisée et permet d'imager en 3D la texture des solutions de collagène. Deux modes de contraste sont utilisés sur un même volume focal : la génération de seconde harmonique et la fluorescence excitée à deux photons.

2.3.2.1 Principe de la génération de seconde harmonique

La génération de seconde harmonique est un processus cohérent du deuxième ordre : un faisceau incident de fréquence ω entraîne la génération d'un faisceau de fréquence harmonique égale à 2ω par diffusion non-linéaire. Ce processus est causé, au niveau moléculaire, par l'oscillation d'électrons polarisables et donc au niveau macromoléculaire, ce sont les champs électriques des dipôles induits qui vont interférer. L'organisation tridimensionnelle des molécules dans le volume focal est ainsi importante pour obtenir un signal SHG.

Si l'on considère une liaison moléculaire ou une molécule seule interagissant avec une onde électromagnétique, un électron de cette molécule va osciller. Selon le modèle de Lorentz, le potentiel de l'électron excité évolue comme le potentiel d'un oscillateur harmonique. Ainsi la fréquence à laquelle oscille cet électron est égale à celle de l'onde d'excitation. Il s'agit de la diffusion de Rayleigh. En réalité, le potentiel n'étant pas parfaitement parabolique, on assiste à la génération d'harmoniques. Quand le potentiel est symétrique, seules les harmoniques multiples impaires de la longueur d'onde excitatrice sont générées. Dès lors, une molécule centrosymétrique ne peut pas créer de signal SHG.

La polarisation \vec{p} est donnée par la relation :

$$\vec{p} = \alpha \cdot \vec{E} + \beta \cdot \vec{E} \cdot \vec{E} + \gamma \vec{E} \vec{E} \vec{E} + \dots \quad \text{Équation 2-9}$$

avec α la polarisabilité linéaire, β et γ les hyperpolarisabilités du premier et second ordre et :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cdot e^{-i\omega t} + cc \quad \text{Équation 2-10}$$

Dans cette expression : ω est la pulsation de l'onde et cc le complexe conjugué.

On considère alors deux molécules non-centrosymétriques, séparées par une distance faible devant la longueur d'onde incidente pour qu'elles puissent voir la même onde. Lorsque ces deux molécules sont alignées parallèlement dans une même direction, les rayonnements harmoniques générés sont les mêmes pour les deux molécules.

La polarisation d'ordre 2 qui est identique pour les deux molécules est donnée par :

$$\overrightarrow{p^{(2)}}(2\omega) = \beta \cdot \overrightarrow{E(\omega)} \cdot \overrightarrow{E(\omega)} \quad \text{Équation 2-11}$$

Ainsi, ces rayonnements harmoniques interfèrent de manière constructive et le champ total est le double de celui d'un dipôle unique. Comme l'intensité diffusée est le carré du champ total, on a une intensité 4 fois supérieure à celle obtenue dans le cas d'une molécule seule. Cependant, si les polarités des molécules sont opposées, on a des interférences destructives avec, pour résultat, un signal nul. L'intensité du signal diffusé

varie donc quadratiquement avec le nombre de molécules organisées avec la même polarité dans le volume focal.

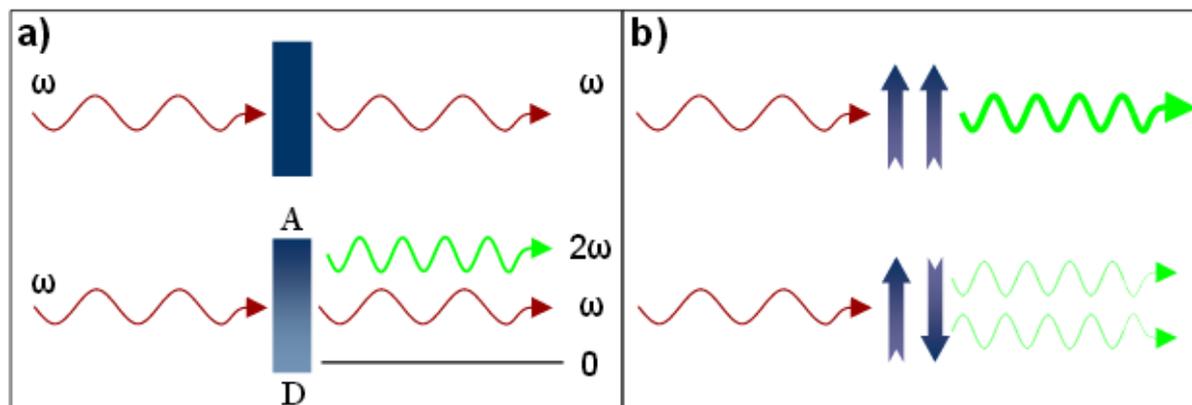


Figure 2-8 : a) Lorsque l'on excite une molécule symétrique, la fréquence du rayonnement d'excitation est égale à celle du rayonnement diffusé : c'est la diffusion de Rayleigh. Si la molécule est non centro-symétrique on a à la fois la diffusion de Rayleigh et la diffusion harmonique (rayonnement de fréquence double) à forte intensité d'excitation.

b) Pour deux molécules non centrosymétriques antiparallèles, les rayonnements sont en opposition de phase et on a alors des interférences destructives avec une intensité diffusée nulle. Si, au contraire, les molécules sont parallèles on a des interférences constructives des rayonnements à la fréquence double 2ω . L'intensité diffusée varie ainsi quadratiquement avec le nombre de molécules non-centrosymétriques parallèles. (tiré de la thèse de M. Strupler, 2008)

2.3.2.2 Origine du signal SHG du collagène

Le signal SHG du collagène provient des liaisons peptidiques au niveau moléculaire. La SHG est sensible aux assemblages de molécules non centrosymétriques et le collagène présente, du fait de l'alignement de ses nombreuses liaisons peptidiques (Figure 2-9), une hyperpolarisabilité du second ordre non négligeable (Figure 2-10). Le collagène, du fait de ses trois hélices α possède une symétrie C_3 mais par souci de simplification, on lui attribue une symétrie C_∞ .

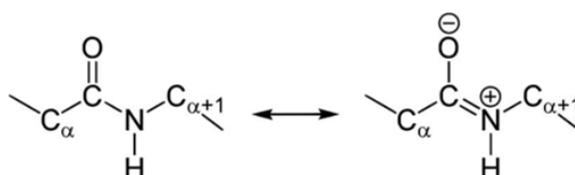


Figure 2-9 : Représentation d'une liaison peptidique. Ces liaisons sont à l'origine du signal SHG de la molécule de collagène (tiré de Bancelin, 2013).

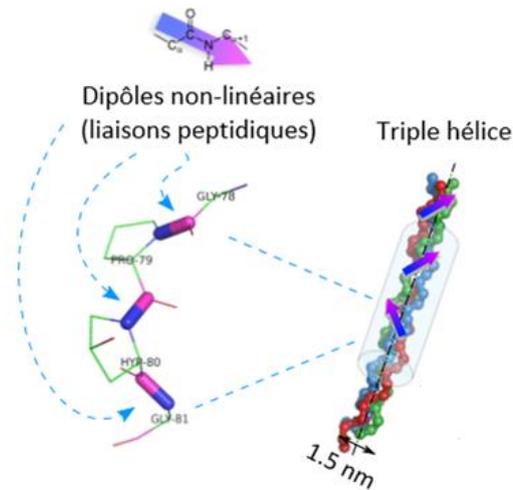


Figure 2-10 : L'origine du signal SHG dans le collagène est liée à l'hyperpolarisabilité β des liaisons peptidiques présentes dans la molécule de collagène. Ainsi le signal SHG va dépendre de l'organisation de ces liaisons dans le volume d'excitation donc de l'organisation 3D des triples hélices. La triple hélice présente une symétrie C[∞]. (C. Teulon, 2016)

La compacité et la rigidité de la triple hélice permet d'assurer qu'un nombre important d'harmonophores (les liaisons peptidiques) soient bien alignés le long de l'axe moléculaire, ce qui permet d'amplifier de manière cohérente le signal SHG. De même, la sommation cohérente des signaux de seconde harmonique de chaque triple hélice au sein d'une fibrille explique le signal SHG important du collagène fibrillaire.

2.3.2.3 Dispositif expérimental

L'imagerie de seconde harmonique a été réalisée à l'Ecole polytechnique au sein du laboratoire d'Optique et Biosciences avec un microscope à balayage laser. L'excitation est fournie par un laser femto-seconde titane-saphir (Mai-Tai, Spectra-Physics) réglé à 860 nm. On a utilisé une polarisation circulaire dans le but d'imager toutes les structures indépendamment de leur orientation dans le plan focal. Les microcellules présentant des phases cristal-liquides ont été imagées avec un objectif 60x1,2 NA offrant une résolution de 0,3 μm (latéral) x 0,9 μm (axial).

On détecte simultanément la génération de seconde harmonique et la fluorescence excitée à 2 photons (2PEF) dans deux canaux équipés de tubes photomultiplicateurs compteurs de photons (P25PC, Electron tubes) et de filtres spectraux appropriés pour rejeter l'excitation laser (FF01-680SP, FF01-720SP, Semrock) et ne sélectionner que le signal SHG (FF01-427/10, Interferential Filter, Semrock) ou le signal 2PEF (GG455 Colored Filter, Schott). L'imagerie est réalisée généralement une trentaine de minutes après l'arrêt de l'injection de la solution de collagène dans la microcellule. La puissance délivrée dans l'échantillon était de 3 à 10 mW avec un temps d'acquisition de 10 μs /pixel. Des piles d'images en deux dimensions sur toute l'épaisseur de la microcellule sont

obtenues. Le pas axial est de 1 μm alors que les pixels latéraux ont une taille de 0,16 μm . Nous n'avons pas observé de perturbations dans la texture des échantillons dans ces conditions d'imagerie sous excitation continue. Ceci était attendu compte tenu de la très grande viscosité des solutions concentrées dans les zones d'intérêt à l'intérieur des microcellules. La fluorescence excitée à deux photons a été utilisée afin d'établir une gamme étalon permettant de connaître la concentration en collagène des zones observées dans les microcellules. Ce signal est en effet proportionnel à la quantité de collagène dans le volume focal. La Figure 2-11 présente un exemple d'image obtenue. Le signal SHG présente une alternance de franges brillantes et sombres comme en microscopie en lumière polarisée. Les franges brillantes correspondent à des triples hélices dans le plan de l'image, et les franges sombres à des triples hélices perpendiculaires à ce plan.

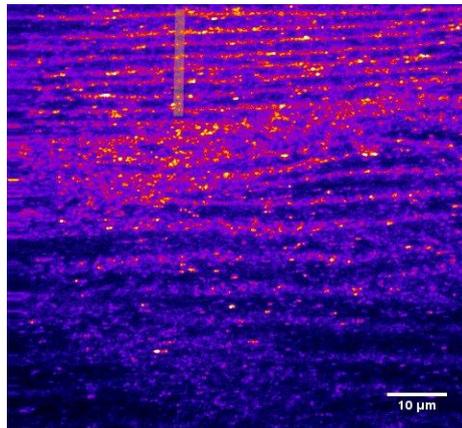


Figure 2-11 : Exemple de phase cristal-liquide formée par le collagène dans une microcellule et observé par SHG en polarisation circulaire. La condition physico-chimique utilisée est la condition 23, qui donne un contreplaqué. On retrouve ici la structure observée en lumière polarisée avec une alternance de franges sombres et brillantes caractéristiques du contreplaqué.

2.3.2.4 Microscopie SHG résolue en polarisation

Afin d'avoir une bonne vision de l'organisation tridimensionnelle du collagène, nous avons utilisé la SHG résolue en polarisation, une technique élaborée par Roth et Freund (Roth & Freund, 1979). Grâce à cette technique, l'organisation des triples hélices de collagène dans le volume d'excitation et donc de la phase cristal-liquide formée peut être déterminée. Il s'agit d'exciter l'échantillon (la microcellule dans laquelle s'est formée la phase cristal-liquide) avec un champ polarisé linéairement mais dont l'orientation dans le plan focal, appelée θ , change.

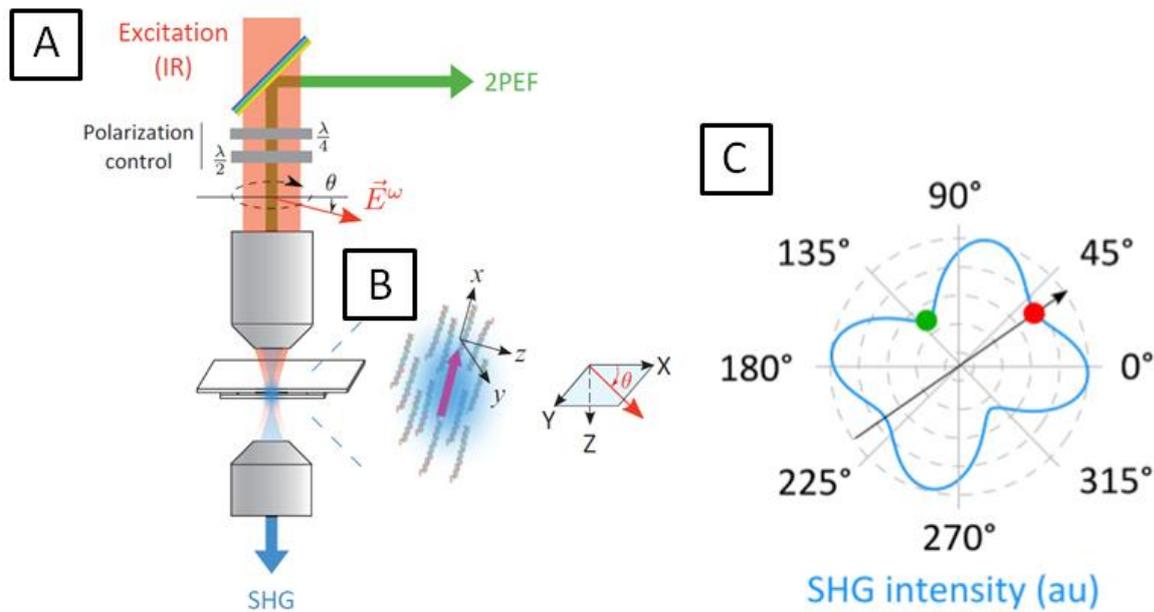


Figure 2-12 : la SHG en polarisation consiste à exciter l'échantillon avec un faisceau polarisé linéairement dont on fait varier l'angle θ . A : Représentation schématique du montage expérimental. L'angle de polarisation θ de l'excitation est contrôlé grâce à deux lames d'ondes achromatiques. Le champ excitateur E^ω est focalisé à travers un objectif. Le rayonnement de second harmonique est détecté vers l'avant avec un condenseur ($NA \approx 1$) et le signal 2PEF vers l'arrière à travers l'objectif focalisant. B : zoom schématique du volume d'excitation. La flèche rose donne l'orientation moyenne des triples hélices présentes dans le volume d'excitation. (x,y,z) est le repère correspondant avec l'axe x dans la direction moyenne des triples hélices. (XYZ) est le repère du laboratoire. La polarisation incidente E^ω est représentée par la flèche rouge et est supposée être contenue dans le plan de l'image (XY) . C : C'est un diagramme d'intensité donnant une statistique d'orientation des molécules de collagène au sein du volume focal. (D'après C. Teulon, 2016)

Cela permet de tracer un diagramme qui donne l'intensité SHG en fonction de l'angle θ comme la Figure 2-12C. Cette figure donne l'intensité au sein du volume focal en fonction de θ . On obtient alors plusieurs informations importantes :

- L'orientation moyenne des triples hélices dans le plan de l'image qui est représentée par une flèche noire sur la Figure 2-12.
- L'intensité SHG moyenne qui dépend de la densité de triples hélices et de leur organisation, notamment de leur angle par rapport au plan focal.
- Le désordre d'orientation des triples hélices qui est donné par un paramètre noté ρ et qui correspond à la racine du rapport des intensités détectées pour une polarisation incidente parallèle (respectivement perpendiculaire) à la direction des triples hélices.

2.3.2.5 Théorie de la microscopie SHG résolue en polarisation

La réponse SHG d'un milieu est caractérisée par son tenseur de susceptibilité non linéaire du deuxième ordre $\chi^{(2)}$. Il lie la polarisabilité $P^{2\omega}$ au champ électrique incident E^ω :

$$P_i^{2\omega} = \chi_{ijk}^{(2)} E_j^\omega E_k^\omega \quad \text{Équation 2-12}$$

avec i, j et k qui correspondent aux directions x, y et z . Les triples hélices de collagène sont supposées alignées suivant x dans le volume d'excitation avec un désordre minimal. En supposant que les triples hélices présentent une symétrie cylindrique et en appliquant la symétrie de Kleinman (Kleinman, 1962) seules 7 composantes du tenseur sont non nulles et elles ne prennent que deux valeurs différentes :

$$\beta_{xxx} \text{ et } \beta_{zzz} = \beta_{xyy} = \beta_{zxx} = \beta_{yxy} = \beta_{zzx} = \beta_{yyx}$$

Cela implique que la polarisabilité à la fréquence harmonique 2ω s'écrit :

$$\begin{cases} P_x^{2\omega} = \chi_{xxx}^{(2)} E_x^2 + \chi_{xyy}^{(2)} E_y^2 + \chi_{xzy}^{(2)} E_z^2, \\ P_y^{2\omega} = 2\chi_{xyy}^{(2)} E_x E_y \\ P_z^{2\omega} = 2\chi_{xzy}^{(2)} E_x E_z \end{cases} \quad \text{Équation 2-13}$$

En appelant (X, Y, Z) le repère du laboratoire, l'orientation moyenne des triples hélices peut être entièrement décrite avec les angles polaire et azimutal φ et ψ présentés sur la Figure 2-13.

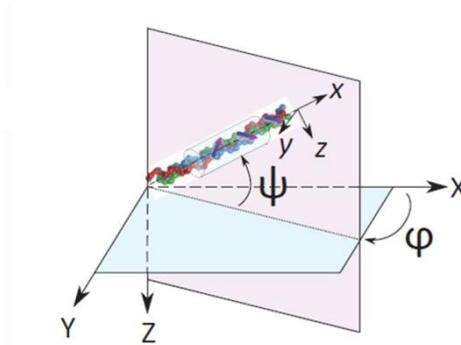


Figure 2-13 : Les deux angles φ et ψ décrivent l'orientation des molécules dans le volume d'excitation : l'orientation dans le plan de l'image φ ; et l'orientation hors du plan donnée par ψ qui peut être mesurée à partir de deux paramètres, l'intensité SHG moyenne I_{mean} et le paramètre d'anisotropie ρ .

Dans cette figure, les angles représentés sont les suivants:

- φ est l'orientation des triples hélices dans le plan de l'image (XY) et est directement mesuré par des mesures résolues en polarisation
- ψ est l'angle hors plan.

Pour des mesures en SHG résolue en polarisation (P-SHG), le champ électrique incident est normal à la direction de propagation Z de la lumière dans le référentiel du laboratoire (XYZ), avec un angle θ par rapport à l'axe X . Ainsi ses composantes sont :

$$E_X^\omega = E_0 \cdot \cos \theta; E_Y^\omega = E_0 \cdot \sin \theta \text{ et } E_Z^\omega = 0$$

L'intensité SHG totale $I^{2\omega}$ est alors calculée en transposant le tenseur de susceptibilité du référentiel de la triple hélice (xyz) au référentiel du laboratoire (XYZ). En effet, les symétries sont valables dans le repère de la triple hélice mais il faut se placer dans le référentiel du laboratoire pour exprimer le champ électrique incident. Les triples hélices ne se trouvent pas forcément dans le plan focal. $I^{2\omega}$ s'écrit de la façon suivante :

$$I^{2\omega}(\theta) = \cos^2(\psi) \cdot \{A(\psi) \cdot \cos[4(\theta - \varphi)] + B(\psi) \cdot \cos[2(\theta - \varphi)] + C(\psi)\} \quad \text{Équation 2-14}$$

où $A(\psi)$, $B(\psi)$ et $C(\psi)$ sont directement liés aux composantes du tenseur de susceptibilité dans le repère (XYZ) et peuvent être exprimés en fonction des composantes de susceptibilité des triples hélices dans le repère (xyz) et de l'angle hors-plan ψ de leur orientation moyenne.

Ainsi, trois paramètres quantitatifs sont extraits de $I^{2\omega}(\theta)$ (mesurée pour différents angles d'excitation) et permettent d'obtenir des informations sur l'orientation 3D des triples hélices :

- l'orientation φ des projections des triples hélices dans le plan (XY) de l'image
- l'intensité SHG moyenne I_{mean} qui est directement reliée à ψ au premier ordre par la relation :

$$I_{mean} \propto \cos^2(\psi) \quad \text{Équation 2-15}$$

Ainsi, cela implique que l'on a plus de signal si les triples hélices sont dans le plan de l'image. Si elles sont perpendiculaires à ce plan, il y a moins de signal.

- le paramètre d'anisotropie ρ . Ce paramètre est calculé comme la racine carrée du rapport de l'intensité pour une excitation parallèle ou perpendiculaire à la direction des molécules :

$$\rho = \sqrt{\frac{\zeta^{2\omega}(\varphi)}{\zeta^{2\omega}(\varphi + \frac{\pi}{2})}} = \sqrt{\frac{A(\psi) + B(\psi) + C(\psi)}{A(\psi) - B(\psi) + C(\psi)}} \quad \text{Équation 2-16}$$

Ce rapport dépend uniquement de la structure moléculaire du collagène pour des triples hélices parfaitement alignées dans le plan focal. Il augmente avec l'angle hors plan ψ ou avec un désordre d'orientation de ces triples hélices dans le volume focal (Gusachenko *et al.*, 2010). En ce qui concerne l'angle hors plan ψ on a la relation :

$$\rho = \rho_{tr} \cos^2(\psi) + 3 \sin^2(\psi) \quad \text{Équation 2-17}$$

avec $\rho_{tr} = \frac{\chi_{xxx}^{(2)}}{\chi_{xyy}^{(2)}}$ le ratio obtenu pour des triples hélices alignées dans le plan (XY).

2.3.2.6 Mesure de la concentration en collagène

La concentration en collagène a été mesurée grâce à la fluorescence excitée à deux photons. La calibration, réalisée à partir de solutions de collagène dont la concentration a été calculée par dosage de l'hydroxyproline (voir début du chapitre), permet de relier la concentration à l'intensité du signal 2PEF. La courbe de calibration est présentée dans la Figure 2-14

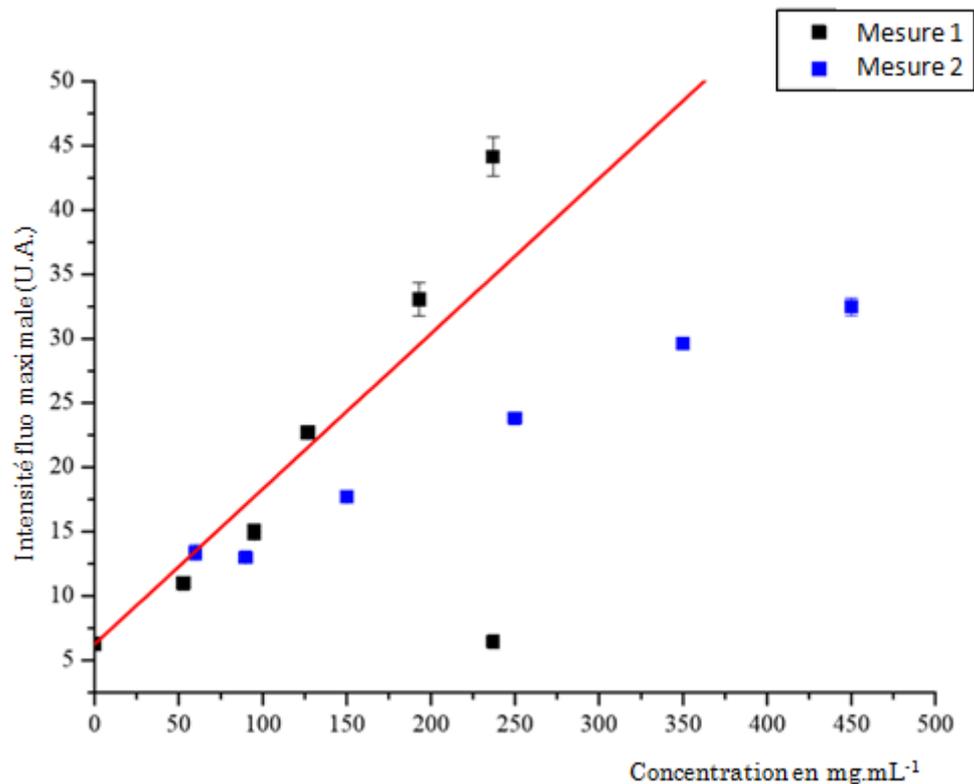


Figure 2-14 Calibration de la concentration en collagène en fonction du signal 2PEF détecté (tiré de Teulon, 2016)

Cependant, cette courbe montre une forte dispersion des valeurs et nous n'avons pu déterminer avec précision la valeur de la concentration de transition de phase, celle-ci variant d'une microcellule à l'autre. Ces variations peuvent être dues aux impuretés résiduelles présentes dans les différentes solutions de collagène. En utilisant la même méthode que Frédéric Gobeaux (2007), il a été montré par François Portier que la concentration de transition se situe entre 32 et 35 mg/mL.

Avec la fluorescence excitée à deux photons, on peut déterminer si la concentration en collagène est homogène sur une image.

2.3.3 Techniques utilisant le rayonnement électronique

Les travaux de Louis de Broglie (1892-1987) qui associe à toute particule, et notamment aux électrons, une longueur d'onde, sont à l'origine de la microscopie électronique. Ainsi, si les électrons peuvent être utilisés comme une onde, ils peuvent être focalisés et utilisés comme faisceau. Ruska réalise alors les premières bobines électromagnétiques qui peuvent focaliser les électrons et le premier microscope électronique en 1933 avec une résolution de quelques nanomètres.

2.3.3.1 Microscopie à balayage

Principe

La microscopie électronique à balayage a été développée dans les années 30 par Knoll et Von Ardenne : Knoll avait conçu un système de balayage des électrons tandis que Von Ardenne installa en 1938 des bobines de balayage dans un microscope électronique à transmission. Ainsi, c'est en 1942 que Zworkyn, Hillier et Snyder publient les détails du premier microscope électronique à balayage.

Le principe est d'émettre, à partir d'une cathode, un faisceau très fin d'électrons qui va balayer la surface de l'échantillon. Les électrons réémis par la surface de l'échantillon sont analysés par un détecteur. Les différentes particules émises après interaction avec l'échantillon, à savoir électrons secondaires, rétrodiffusés et photon-X permettent de fournir des informations chimiques et topologiques sur la surface de l'échantillon. L'analyse en fluorescence X permet de déterminer la composition chimique (Figure 2-15).

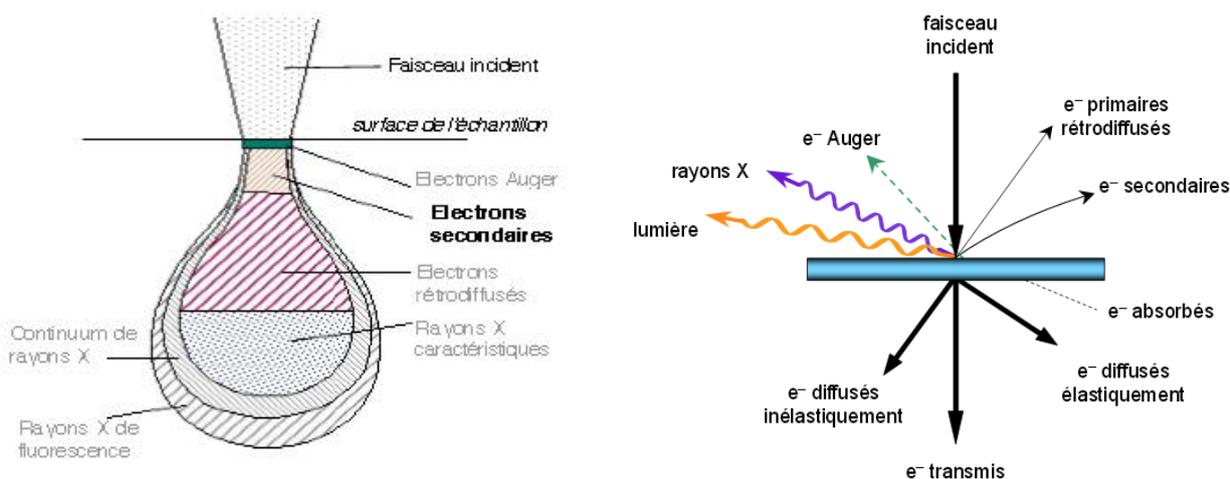


Figure 2-15 : Interaction électron matière et poire d'interaction

Electrons secondaires

Ce sont des électrons de faible énergie (5 à 50 eV au maximum) qui fournissent des informations sur la topographie de la surface sur une profondeur de 10 nm et résultent d'un processus de diffusion inélastique. Lorsqu'un électron incident interagit avec les électrons d'un atome, il ressort avec une perte d'énergie. Un électron secondaire est alors émis et l'atome est ionisé par éjection de ce dernier. Les électrons secondaires sont faiblement liés à la bande de conduction. Un électron incident peut entraîner l'éjection de plusieurs électrons secondaires mais leur faible énergie fait que seuls ceux situés à proximité de la surface (moins de 10 nm) sortent de l'échantillon. Ils donnent une image caractéristique de la surface puisqu'un changement topographique va modifier le nombre d'électrons secondaires émis, utiles à la visualisation des contours.

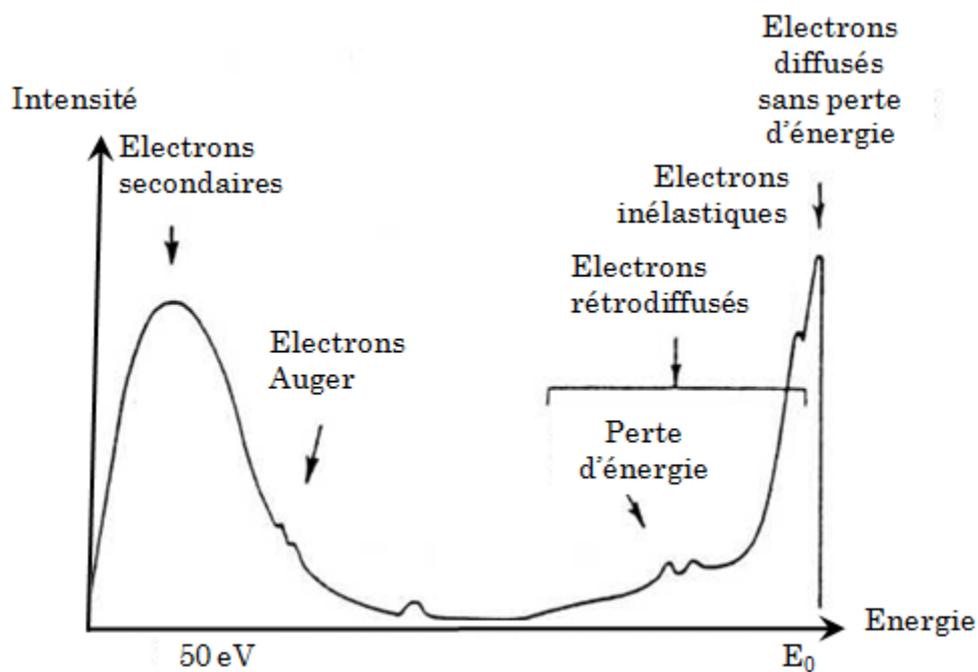


Figure 2-16 : Energie associée aux différents types d'interaction

Electrons rétrodiffusés

Les électrons rétrodiffusés, de plus grande énergie (supérieure à 50 eV), résultent de l'interaction élastique entre un électron incident avec un atome de l'échantillon, c'est-à-dire que l'électron primaire ressort avec la même quantité de mouvement. L'électron primaire subit une interaction coulombienne avec le noyau d'un atome et est rétrodiffusé élastiquement. Ils n'ont pas une bonne sensibilité topographique mais plus le numéro atomique de l'atome visé est grand, plus le signal est intense. Cela signifie que la quantité d'électrons rétrodiffusés augmente avec le numéro atomique, le coefficient de rétrodiffusion en étant fonction. Ainsi, ils renseignent sur la composition chimique de l'échantillon.

Photon X

Un photon X est émis quand un électron primaire, entrant en collision avec un atome, éjecte un électron d'une couche interne. Ce dernier est remplacé par un électron d'une couche supérieure et ainsi un photon dont l'énergie est égale à la différence des niveaux d'énergie électronique est émis. Une analyse chimique quantitative est possible par l'analyse des photons X.

Afin d'observer les matrices denses fibrillées au MEB, on effectue un séchage supercritique (Bal-Tec 030) pour conserver le plus possible la structure tridimensionnelle.

Pour cela, les échantillons sont fixés dans du glutaraldéhyde (tampon cacodylate 0,4 M) puis soumis à des bains d'éthanol 70, 95 et 100% d'une durée de 30 min chacun. On remplace ensuite progressivement, sous 60 bars, l'alcool 100% par du dioxyde de carbone liquide. Lui-même sera éliminé en augmentant la température jusqu'à 31,1°C, le point critique.

On recouvre alors les échantillons secs d'une couche d'or de 10 nm.

2.3.3.2 Cryo-SEM-FEG

Le cryo-SEM-FEG est une technique qui permet d'étudier les échantillons biologiques au plus près de leur état naturel. L'échantillon est fixé en étant congelé dans de l'azote pâteux ou à haute pression. L'échantillon est ensuite transféré dans une chambre sous vide où il est recouvert d'un métal conducteur puis observé sous vide. Les expériences de cryo-SEM-FEG ont été effectuées par Marc Schmutz à l'Institut Charles Sadron de Strasbourg

2.3.3.3 Microscopie électronique à transmission

Un microscope électronique à transmission est composé de plusieurs étages : la source d'où sont émis les électrons; une zone "condenseur" où se forme la sonde électronique c'est-à-dire la forme du faisceau qui va interagir avec l'échantillon; un étage objectif où l'on forme l'image de l'échantillon et finalement une zone de projection où est agrandie l'image de l'échantillon. L'ensemble de la colonne est sous un vide poussé (*cf.* Figure 2-17).

Le canon

C'est ici que sont émis les électrons, en chauffant un filament de métal qui correspond à la cathode. Pour extraire les électrons il y a deux manières de procéder. L'extraction peut être faite en chauffant le métal à une température avoisinant sa température de fusion

(2400°C pour le tungstène, 1500°C pour l'héxaborure de lanthane) : c'est une émission thermoionique. Une fois émis, les électrons sont accélérés et focalisés au niveau du Whenelt. Une autre façon d'extraire les électrons est l'émission par effet de champ. L'extraction est obtenue par application d'une forte différence de potentiel (une centaine de kV) entre la cathode (le filament) en forme de pointe et l'anode. La longueur d'onde des électrons émis est inversement proportionnelle à la tension appliquée, appelée tension d'accélération. La résolution du microscope dépend entre autres de cette tension. La cathode étant en forme de pointe, l'émission est très directive et ne nécessite pas l'utilisation d'un whenelt.

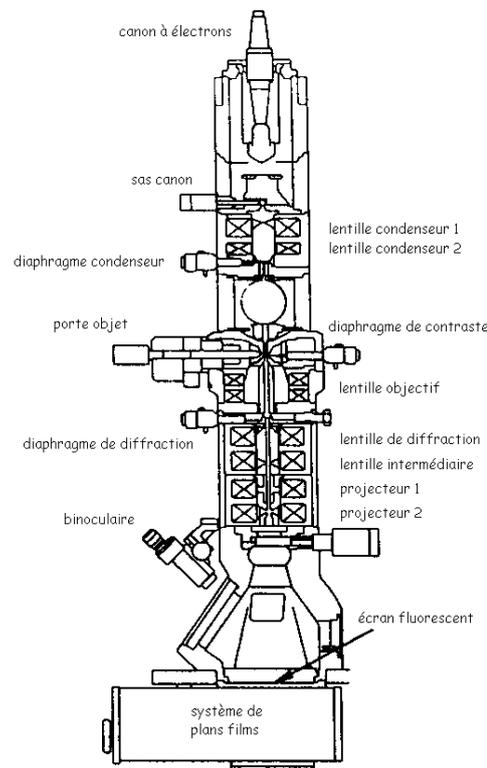


Figure 2-17 : Colonne d'un microscope électronique à transmission

La partie condenseur

Les électrons émis par le canon sont utilisés par les lentilles pour créer la sonde électronique. L'axe des lentilles est parallèle au trajet des électrons et permet de les focaliser. La distance focale des lentilles est liée au nombre d'ampères-tour de la bobine. Ainsi, en variant le courant qui traverse la bobine, la distance focale de la lentille peut être modifiée et *a fortiori*, le champ magnétique produit. Les bobines sont souvent faites d'éléments en fer doux afin de pouvoir augmenter considérablement le champ magnétique. Les lentilles électromagnétiques sont directement utilisées pour concentrer le faisceau sur l'échantillon après passage des électrons dans un diaphragme de champ.

L'objectif

Le faisceau d'électrons traverse ensuite l'échantillon où se produisent diverses interactions électrons-matière. Il y a les interactions sans perte d'énergie dites élastiques et les interactions inélastiques. Dans ce cas, lorsque les électrons interagissent avec les atomes de l'échantillon, ils perdent de l'énergie. Ils vont être plus ou moins absorbés et diffractés. La résolution est limitée par les aberrations optiques qui proviennent essentiellement de la lentille objectif. Les trois principaux types d'aberrations rencontrés sont les suivants :

- la défocalisation qui signifie que l'échantillon est mal positionné par rapport au plan objet de la lentille objectif, c'est l'erreur de mise au point
- l'astigmatisme qui correspond à une différence de focalisation de rayons se propageant dans des plans différents,
- les aberrations sphériques qui sont une différence du point de focalisation.

Il peut aussi y avoir un phénomène de distorsion ou bien des aberrations chromatiques.

Le faisceau résultant de ces interactions va être agrandi par les lentilles qui se trouvent en bas de la colonne après l'échantillon. Les échantillons biologiques sont essentiellement formés par des atomes légers qui interagissent très peu avec les électrons. Ainsi, pour pouvoir observer des échantillons biologiques comme le collagène, il peut être utile de les contraster avec des métaux lourds comme de l'acétate d'uranyle.

L'image finale est formée sur un écran associé à une caméra CCD.

Dans ce travail, nous avons utilisé un microscope électronique à transmission FEI Tecnai Spirit G2 opérant à 120 kV. Les images sont enregistrées avec une caméra CCD (Orius Gatan 832 Digital).

2.3.3.4 Préparation des échantillons pour la microscopie à transmission***Préparation standard***

Les échantillons pour la microscopie électronique à transmission sont fixés chimiquement afin de conserver la structure microscopique en créant des ponts covalents entre les différentes molécules. Ainsi, les échantillons fibrillés et rincés sont d'abord fixés avec du glutaraldehyde à 3,63 % dans un tampon cacodylate/saccharose (0,05M/0,3 M; pH=7,4) pendant 1h30 à 4°C. Des pontages entre les groupements aminés libres sont ainsi créés. Ensuite, les échantillons subissent une deuxième fixation dans du tétraoxyde d'osmium à 2% dans un tampon cacodylate/saccharose puis progressivement déshydratés dans des bains d'éthanol à 70, 90 et 95% d'une durée de 5 min et, enfin, dans trois bains successifs d'éthanol 100% de 10 minutes chacun. L'alcool est ensuite remplacé progressivement (en trois étapes) par de l'oxyde de propylène. Après, les échantillons sont plongés dans de l'araldite. La composition de la résine est la suivante : 20 mL

d'araldite CY212 (Agar Scientific), 1,1 mL de BDMA l'accélérateur de durcissement et 20 mL de DDSA, le durcisseur. Les échantillons placés dans les moules sont ensuite mis à l'étuve pendant 3 jours à 60°C.

Avec un microtome, les blocs sont coupés en sections ultrafines (70 nm) colorées avec de l'acétate d'uranyle (solution à 0,5% dans le l'alcool) et observées.

La Figure 2-18 présente un exemple d'image TEM d'une matrice fibrillée:

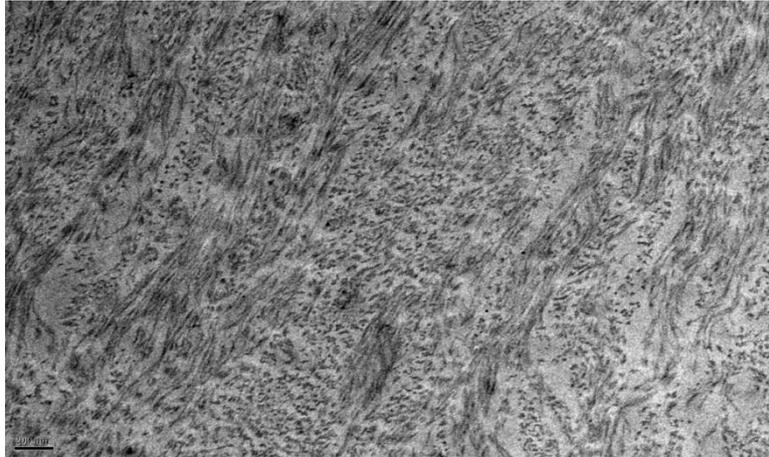


Figure 2-18 : Image TEM d'une matrice fibrillée synthétisée avec la condition 23. On voit une alternance de zones où les fibrilles sont dans le plan de l'image avec des zones où elles sont perpendiculaires à ce même plan. Cela est proche d'une structure en contreplaqué de type « cornée ».

Préparation des échantillons par cryofracture

La cryofracture est une technique de préparation d'échantillons pour la microscopie électronique à transmission. Il s'agit dans un premier temps de congeler dans de l'azote liquide un échantillon confiné entre deux capsules en cuivre. Celui là est alors fracturé par écartement des capsules tout en maintenant le système à la température de l'azote liquide. Les surfaces désormais exposées sont recouvertes d'un film de carbone et de platine d'une vingtaine de nanomètres par pulvérisation sous vide à 45° puis à 90° par rapport à la surface (Figure 2-19). Ensuite, la dissolution des échantillons permet de récupérer les répliques. L'angle utilisé pour la pulvérisation permet l'obtention d'un ombrage des reliefs de la structure des échantillons. Les films obtenus sont placés sur une grille de TEM en cuivre pour observation. Ces manipulations ont été effectuées avec M. Schmutz à l'Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et cellulaire (IGBMC) de Strasbourg sur un appareil développé par J-C Homo.

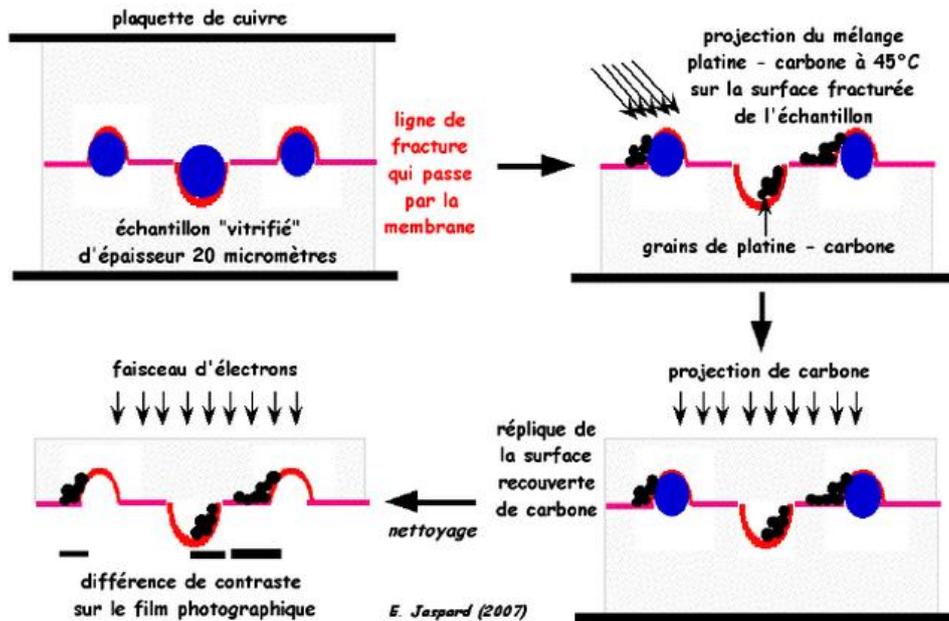


Figure 2-19 : Principe de la cryofracture (d'après E. Jaspard, 2007).

2.3.4 Mesures mécaniques

Des mesures de traction ont été effectuées pour caractériser mécaniquement les matrices de collagène et des mesures de rhéologie pour les solutions de collagène.

2.3.4.1 Détermination du module d'Young

Les mesures mécaniques, réalisées par Barbara Lynch et Jean-Marc Allain, ont été effectuées sur un système développé au Laboratoire de Mécanique des solides de l'Ecole Polytechnique. Le système est composé de deux moteurs (drl42pa2g-04, Oriental Motor, Tokyo, Japan) et de deux capteurs (Futek, LPM200, 2lb) de part et d'autre de l'échantillon. Le système étant symétrique, il permet d'imager continuellement la région centrale de l'échantillon. Les échantillons, au départ sous forme de disque, sont découpés en forme d'éprouvette (1 cm de largeur pour 1,4 cm de longueur) afin d'avoir une contrainte uni-axiale homogène dans la partie centrale que l'on teste. Le déplacement des moteurs est imposé et on mesure la force résultante chaque seconde. Le déplacement réel est obtenu par corrélation d'image (DIC) pour corriger les éventuels repliements ou le glissement de l'échantillon. Pour pouvoir faire la corrélation d'image, des microbilles de polystyrène (Dynoseeds TS40, Microbeads) sont déposées sur la surface de l'échantillon et fixées avec de la polylysine. On recouvre l'échantillon avec 1 mL de polylysine (Sigma-Aldrich) à une concentration de 2% pendant 20 min. Ensuite on retire la solution et l'échantillon est recouvert avec de l'eau Milli-Q contenant les microbilles de polystyrène qui se fixent grâce à la polylysine. Enfin l'échantillon est rincé de sorte à éliminer les billes non attachées à la surface. On prend une image par seconde et un programme mis au point au laboratoire (CorrelManuv, développé par Michel Bornert),

est utilisé pour mesurer le déplacement réel à la surface ce qui permet également d'apporter des corrections sur la courbe contrainte-déformation. Les dimensions exactes de chaque échantillon sont déterminées avec un calibre numérique alors que l'épaisseur des échantillons est mesurée par OCT (Tomographie par cohérence optique).

La contrainte nominale est déterminée en reliant la force de traction à la section initiale de l'échantillon. La déformation ε est donnée par :

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad \text{Équation 2-18}$$

où l_0 est la longueur initiale de l'échantillon et Δl la variation de longueur. La pente de la courbe contrainte-déformation pour les petites déformations dans le domaine élastique correspond au module d'Young E de l'échantillon. Il est obtenu à partir de la relation :

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad \text{Équation 2-19}$$

où σ est la contrainte appliquée. La vitesse de déplacement est de 0,01 mm/s.

2.3.4.2 Mesures rhéologiques sur des solutions organisées de collagène

Les mesures des propriétés mécaniques par rhéologie ont été réalisées au laboratoire Matière et Système Complexe de l'Université Paris Diderot sous la conduite et l'expertise de Sophie Asnacios.

Les structures polymères et celles rencontrées dans le domaine des biomatériaux et de l'ingénierie tissulaire sont très complexes et couramment analysées du point de vue de leurs propriétés rhéologiques. De nombreuses recherches se sont intéressées aux propriétés mécaniques du collagène avant ou après fibrillogenèse (Gobeaux, 2007; Gobeaux *et al.*, 2010; Arevalo *et al.*, 2010; Jordan *et al.*, 2011). Ces travaux portent principalement sur la dépendance du module élastique en fonction de la concentration des molécules et sur l'influence des cellules sur ces mêmes propriétés.

Théorie

En réponse à une contrainte extérieure appliquée σ , le comportement des solides est borné par deux comportements idéaux :

- les solides purement élastiques, dont la déformation γ est proportionnelle à la contrainte σ qui leur est imposée par l'intermédiaire du module G
- les liquides newtoniens purement visqueux, qui s'écoulent en se déformant infiniment lorsqu'une contrainte constante leur est appliquée et pour lesquels on a la relation : $\sigma = \eta_{app} \cdot \dot{\gamma}$ où η_{app} est la viscosité apparente (en Pa.s) et $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (ou vitesse de cisaillement) défini par $\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$.

Les solides réels ont un comportement mixte si bien qu'ils peuvent être décrits par une combinaison de ces deux comportements idéaux. Ils sont alors qualifiés de matériaux

viscoélastiques. Le caractère viscoélastique des matériaux à l'étude est principalement commandé par leur réponse au niveau moléculaire et atomique aux efforts appliqués.

Il existe de nombreux modèles permettant d'obtenir une loi de comportement de ces matériaux : par exemple les modèles de Voigt, Zener, Maxwell (Fung, 1969). Il existe cependant une approche formelle qui permet de caractériser simplement les propriétés mécaniques des matériaux viscoélastiques dans le cadre d'hypothèse de faible déformation. On parlera alors de viscoélasticité linéaire qui caractérise dans ce cas le comportement élastique et dissipatif d'un matériau. Il s'agit de caractériser la réponse du matériau viscoélastique à des oscillations à fréquence variable par un module élastique complexe qui dépend de la fréquence de sollicitation. En régime dynamique, le comportement viscoélastique linéaire est alors représenté par des modules complexes dont la partie réelle caractérise l'élasticité du matériau tandis que la partie complexe caractérise la dissipation qui lui est associée.

On définit alors les grandeurs temporelles suivantes :

- la déformation en cisaillement : $\gamma(t) = \Re[\gamma_m \cdot e^{j\omega t}] = \Re[\gamma^*(t)]$
 - la contrainte de cisaillement : $\sigma(t) = \Re[\sigma_m \cdot e^{j(\omega t + \delta)}] \Re[\sigma^*(t)]$
- Équation 2-20

où : \Re représente le symbole "partie réelle", $\gamma^*(t)$ et $\sigma^*(t)$ les déformation et contrainte complexes, γ_m et σ_m représentent des valeurs maximales, δ le déphasage entre déformation et contrainte, ω est la pulsation en rad.s^{-1} .

De même, en dérivant la déformation en cisaillement, on obtient l'expression du taux de cisaillement :

$$\dot{\gamma}(t) = \frac{d\gamma}{dt} = -\gamma_m \cdot \omega \cdot \sin(\omega t) \quad \text{Équation 2-21}$$

Par analogie à la loi de Hooke (équation 2-12), on peut écrire : $\sigma^* = G^* \cdot \gamma^*$ où G^* représente le module complexe. Ses composantes sont obtenues directement et sont données par le rapport des grandeurs complexes de la contrainte par la déformation :

$$G^*(\omega) = \frac{\sigma^*(t)}{\gamma^*(t)} = \frac{\sigma_m}{\gamma_m} \cdot e^{j\delta} = G'(\omega) + j \cdot G''(\omega) \quad \text{Équation 2-22}$$

On a donc : $G'(\omega) = \Re[G^*(\omega)]$ et $G''(\omega) = \Im[G^*(\omega)]$ avec \Im représente le symbole "partie imaginaire".

La partie réelle du module complexe $G'(\omega)$ est associée 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 ou encore le module élastique. Dans le cas d'un solide élastique pur, cette composante se confond avec le module de Young, et $G''(\omega) = 0$.

La partie imaginaire du module complexe $G''(\omega)$ est appelée module de perte, ou module visqueux. Cette composante est associée à l'énergie de dissipation visqueuse. Dans le cas d'un fluide newtonien de viscosité η , $G''(\omega) = \eta \cdot \omega$ et $G'(\omega) = 0$.

On appelle angle de perte, le rapport de l'énergie dissipée à l'énergie conservée. Il est donné par l'angle de perte ou angle de déphasage δ , exprimé par sa tangente :

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad \text{Équation 2-23}$$

Méthodologie

Le rhéomètre utilisé est du type cône tronqué-plan représenté sur la Figure 2-20. Il permet de réaliser des mesures de contrainte de cisaillement ou des mesures de viscosité dynamique. L'angle du cône β est très petit (de l'ordre de 1 à 3 degrés). La vitesse locale d'un point du cône situé à une distance r de l'axe vaut $\Omega \cdot r$ où Ω est la vitesse angulaire de rotation du cône en rad.s^{-1} . En première approximation, la vitesse de cisaillement (ou le taux de cisaillement) donné en s^{-1} est donnée par la relation :

$$\dot{\gamma} = \frac{\Omega \cdot r}{hH(r)} = \frac{\Omega}{\tan(\beta)} \cong \frac{\Omega}{\beta} \quad \text{Équation 2-24}$$

où $H(r)$ représente l'épaisseur locale. La viscosité dynamique peut être obtenue en appliquant un cisaillement oscillatoire. La contrainte σ est donnée par la relation :

$$\sigma = \frac{3M}{2\pi R_c^3} \quad \text{Équation 2-25}$$

où M est le couple mesuré sur le cône de rayon R_c .

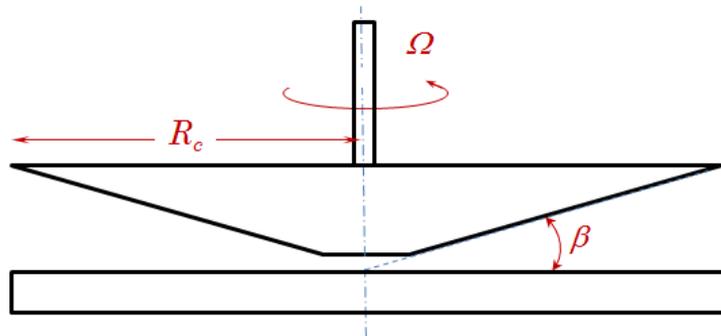


Figure 2-20 Représentation schématique du système utilisé. L'angle β est égal à 0,04 radian.

Durant l'expérience, l'échantillon est maintenu sous atmosphère humide grâce à une cellule fermée hermétiquement. Dans cette cellule, on a introduit un anneau de coton imbibé du solvant de la solution de collagène.

Dans notre cas, les essais de rhéométrie ont été réalisés principalement en régime oscillatoire (Dynamic Frequency Sweep, DFS) afin de déterminer le module élastique G' et le module visqueux G'' . Ces deux modules dépendent de la fréquence de sollicitation. La pulsation ω varie entre 0.01 rad.s^{-1} et 50 rad.s^{-1} , la fréquence f varie donc quant à elle de 1,6 mHz à 7,95 Hz (on rappelle que la pulsation est donnée par $\omega = 2\pi f$).

Le domaine linéaire a d'abord été déterminé pour chacun des échantillons analysés après avoir tracé la courbe reliant la déformation à la contrainte (Dynamic Stress Sweep, DSS). La température est maintenue à 18°C en bain thermostaté contrôlé par une cellule (précision de $\pm 0,1^\circ\text{C}$). Les essais ont été réalisés à différents temps après la mise en place de l'échantillon afin de contrôler l'évolution des grandeurs mesurées au cours du temps.

2.4 Techniques de culture cellulaire

2.4.1 Cornées provenant des donneurs

Les cornées humaines et membranes amniotiques utilisées dans les expériences de cultures de cellules épithéliales proviennent de la banque de tissus ESF-Ile-de-France (Paris). Généralement, l'âge moyen des donneurs est situé aux alentours de 75 ans (65-85 ans) et le temps séparant la mort du donneur de la récupération de la cornée est compris entre 7 et 30h. Ces cornées sont cultivées dans un milieu CorneaMax (Eurobio, Courtaboeuf, France) à 31°C pendant 11 à 20 jours.

2.4.2 Membranes amniotiques

Les membranes amniotiques (MA) ont été récupérées sur des donneuses ayant subi une césarienne. Les donneuses ont toutes été testées négatives pour l'hépatite B, l'hépatite C, l'HTLV ainsi que pour le SIDA et la syphilis. Le placenta est d'abord lavé avec une solution saline contenant des antibiotiques pendant 2 heures puis rincé avec de l'eau stérilisée. Après avoir coupé les bords de la membrane, elle est retirée du placenta, placée sur une surface en nitrocellulose puis coupée en morceaux stockés dans un mélange 1:1 de milieu RPMI (Eurobio) et de glycérol (Haemonetics, Lyon, France) à -80°C pendant 2 ans. Les coupes de membrane amniotiques sont décongelées à température ambiante et rincées avec un tampon phosphate avant leur utilisation.

2.4.3 Culture cellulaire

2.4.3.1 Culture de cellules épithéliales

Généralement, chaque cornée est coupée en 6 explants. Ainsi, 3 explants sont cultivés pendant 14 jours à la surface des matrices et 3 autres à la surface des membranes amniotiques. Pour les expériences réalisées, on utilise en général 3 cornées humaines ce qui porte à 18 le nombre d'explants cultivés : 9 pour les matrices et 9 pour les membranes amniotiques qui servent de référence. Avant de suturer les explants sur les matrices, celles-ci sont rincées plusieurs fois à l'eau Milli-Q et au PBS 1x afin d'éliminer toute trace d'ammoniaque. On contrôle donc le pH des solutions de rinçage pour être certain qu'il est physiologique. Ensuite, les explants sont suturés sur les matrices comme on le voit sur la Figure 2-21 avec la face épithéliale orientée vers le haut de sorte à permettre la migration des cellules des explants vers la matrice ou la membrane amniotique.

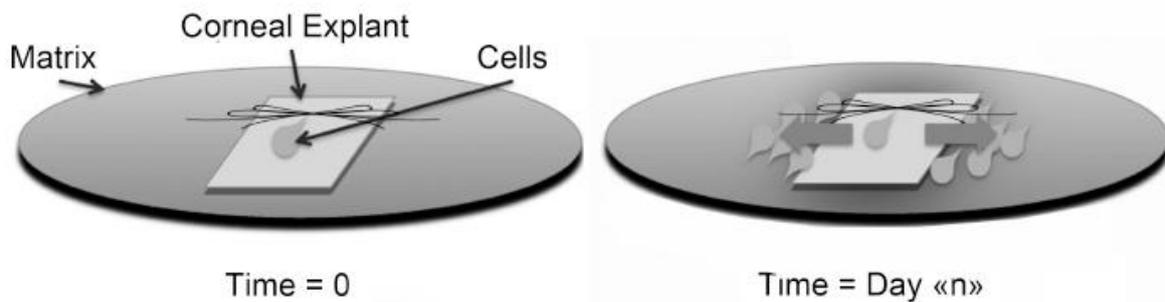


Figure 2-21 : Schéma de la suture de l'explant limbique sur les matrices de collagène fibrillées. Les cellules partent de l'explant pour coloniser la surface de la matrice ou la membrane amniotique (tiré de Tidu *et al.*, 2015).

Le système est immergé dans du milieu de Green, composé d'un mélange 3 pour 1 de calcium free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Dutscher, Brumath, France) et de milieu Ham F12 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) avec 10% de sérum de veau foetal (Invitrogen), 1 mM/mL de tampon HEPES (Invitrogen), 5 mg/mL d'insuline humaine recombinante (Actrapid, Novo Nordisk, Paris, France), 0,4 mg/mL d'hydrocortisone (Pharmacia, Pfizer, Paris, France), 4 mg/mL de L-glutamine (Invitrogen), 2 pM/mL de tri-iodo thyronine (Sigma, Saint Quentin en Yvelines, France), 200 nM/mL d'adénine (Sigma), 100 IU/mL de pénicilline (Invitrogen), 100 mg/mL de streptomycine (Invitrogen), 0,25 mg/mL d'amphotéricine B (Invitrogen) et enfin de 10 ng/mL d'EGF (Human recombinant epithelial growth factor, Sigma). L'ensemble est placé dans une étuve pendant 14 jours à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé 3 fois par semaine.

Etude du phénotype

A la fin de la culture, les explants limbiques sont retirés et les cellules qui ont pu croître sur les matrices sont dissociées en étant exposées à de la trypsine à 0,5 % pendant 8 min. Elles sont comptées avec une lame Kova après avoir fait un marquage au bleu trypan de sorte à éliminer les cellules mortes. Les cellules viables sont caractérisées en regardant le nombre de colonies, par immuno-marquages extraction d'ARN, transcription inverse et RT-qPCR comme cela a été décrit par Ghoubay-Benallaoua *et al.* (Ghoubay-Benallaoua *et al.*, 2013). Pour les cellules épithéliales, on recherchera la présence de la cytokératine 3 qui est un marqueur des cellules épithéliales cornéennes. Pour les cellules souches limbiques, on recherchera p63 α .

2.4.3.2 Intégration des cellules stromales dans le procédé de fabrication

2.4.3.2.1 Obtention des cellules souches stromales (SSC)

Les collerettes (explants annulaires centrés sur le limbe) coupées en explants sont digérées pendant une nuit dans la collagénase A 1mg/ml à 37°C. Les cellules obtenues sont lavées puis comptées. Elles sont mises en culture dans un milieu spécifique l'essential 8, (Life Technologie, France) additionné de pénicilline et de streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 10 jours, le milieu est changé tous les jours. Après 10 jours de culture, des sphères en suspension dans le milieu sont observées comme on peut le voir sur la Figure 2-22. Les cellules sont caractérisées par immunofluorescence, ce que montre la Figure 2-23

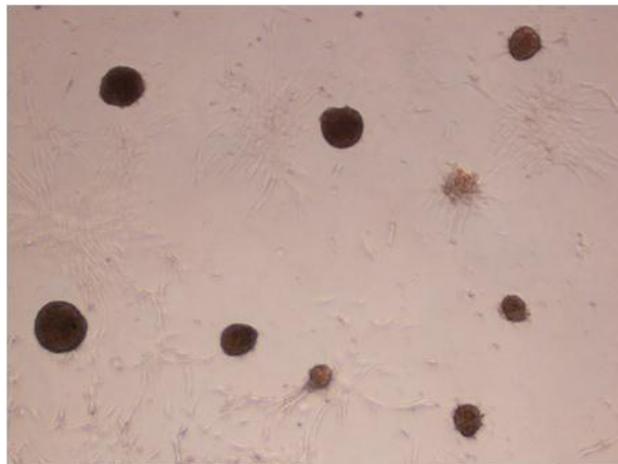


Figure 2-22 : Microphotographie de cellules souches stromales qui sont regroupées en sphères. En fonction du milieu on peut les différencier en kératocytes (qui apparaissent sur cette image, ils sont de forme allongée) ou bien en cellules endothéliales.

2.4.3.2.2 Caractérisation des SSC par immunofluorescence

Après 10 jours de culture les sphères de SSC obtenues sont lavées puis fixées au paraformaldéhyde 4%, les anticorps primaires suivant sont utilisés pour leurs

identifications, Bmi1, nestin, keratocan, pax6. Les sphères sont incubées une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Après 3 lavages au PBS-tween, les sphères sont incubées 1h avec les anticorps secondaires correspondants (Figure 2-23).

2.4.3.2.3 Intégration des SSC dans les matrices de collagène

Après dissociation des sphères à la collagénase 1 mg/ml pendant 5 min, les cellules obtenues sont mises en sandwich entre deux culots de solution de collagène 30 mg/ml. On applique ensuite une pression sur ce système à l'aide d'une lamelle en verre. Les matrices obtenues sont soit fixées et incluses en paraffine soit incubées dans le milieu E8 (voir annexe). Les matrices en culture sont observées régulièrement pour apprécier les changements qui peuvent se produire. Après quelques jours de culture, les matrices sont fixées au PFA 4%, et incluses en paraffine pour faire des coupes histologiques.

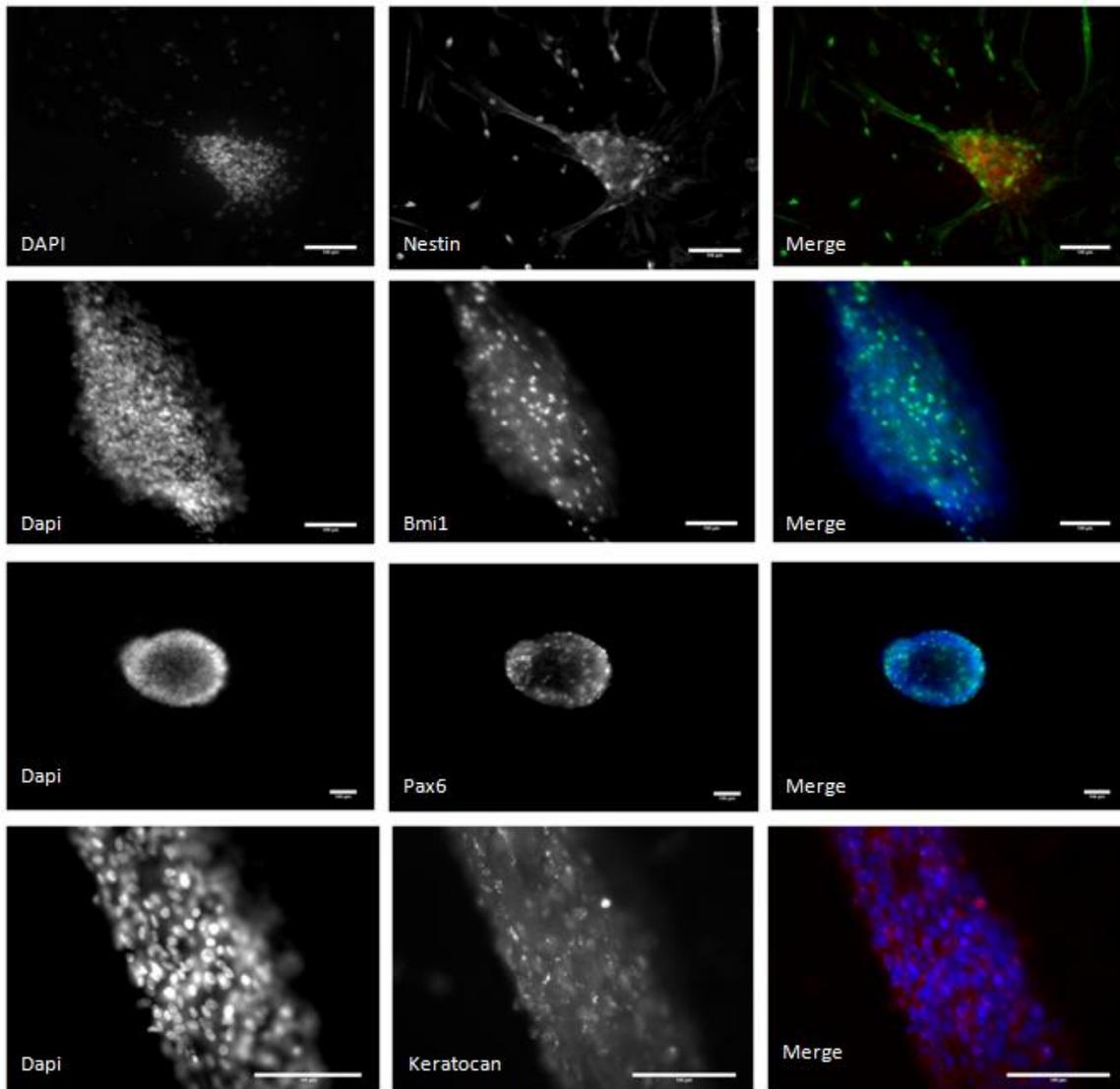


Figure 2-23 : Caractérisation des cellules souches stromales (SSC) par immunofluorescence. Bmi1 est un marqueur du noyau des cellules souches ; la nestin est un marqueur des cellules

souches neuronales et les SSC proviennent de la crête neurale ; le keratocan est un marqueur des cellules souches keratocytaires ; pax6 est le gène maître du développement de l'œil.

2.4.3.3 Culture de cellules endothéliales HUVECs

La culture de cellules endothéliales HUVECs a été réalisée au sein du CIRB (Collège de France) par L. Muller et L. Bidault afin de déterminer si les matrices pouvaient être vascularisées, ce qui n'est pas souhaitable pour une cornée artificielle. Il s'agit de vérifier si ces cellules, qui proviennent de cordons ombilicaux, peuvent pénétrer à l'intérieur des gels fibrillés de collagène pour initier une vascularisation. Les solutions de collagène, à 3 mg/mL et 90 mg/mL (environ 100 μ L), sont coulées dans des "transwell filters" (pores de 8 μ m), aplanies par centrifugation puis fibrillées sous vapeurs d'ammoniaque. S'ensuivent plusieurs rinçages, d'abord à l'eau pendant 2 semaines le temps que les gels soient stabilisés puis dans du PBS 1x et du milieu de culture avant l'ensemencement des cellules. Une fois rincés, les gels sont d'abord placés pendant 24 heures à 37°C (5 % de CO₂) avec une solution chémo-attractive constituée de milieu NHDF avec 10 ng/mL de VEGF et 0,05 % de primocyne. On dépose alors les cellules à la surface des gels avec une densité de 400 000 cellules/cm². Les cellules sont dans du milieu de culture EGCM2 avec 0,001% de primocyne. L'incubation dure 2 semaines et le milieu est changé tous les quatre jours. A la fin de la culture les gels sont fixés avec une solution de PFA à 4% pendant 30 min. Les noyaux sont marqués au DAPI et le cytosquelette avec de la phalloïdine afin de faire des observations au microscope à fluorescence et au Spinning Disk SP5-MP.

2.4.4 Coupes histologiques et colorations

Afin de réaliser des coupes histologiques, les matrices de collagène utilisées pour la culture cellulaire sont fixées pendant 24h avec une solution de para-formaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS.

Ensuite les échantillons sont progressivement déshydratés grâce à des bains d'alcool. D'abord un bain de 24h dans de l'alcool 70%, puis deux bains successifs de 3h dans de l'alcool 95 et 100%. Il s'en suit alors plusieurs bains de butanol sur une durée de 72h. Le butanol est régulièrement changé durant les 72h de bains afin d'éliminer toute trace d'éthanol, la paraffine n'y étant pas miscible. A la suite de ces bains, les matrices sont incluses dans la paraffine liquide pendant 3 heures à 60 °C (température du point de fusion de la paraffine utilisée) puis mises en blocs. Les blocs obtenus grâce aux barres de Leuckart sont cubiques. La paraffine, mélange d'hydrocarbures saturés, a l'avantage d'être chimiquement neutre et relativement simple à couper au rasoir. En effet, avec un microtome, il est possible de réaliser des coupes de quelques micromètres d'épaisseurs (7-10 μ m) qui se soudent entre elles pour former des rubans.

Pour retirer l'excès de paraffine, le bloc est découpé en forme de prisme. Une fois faites, les coupes sont étalées et collées sur des lames en verre. Ceci se fait en déposant les

coupes sur de l'eau et on porte le système à une température légèrement en dessous du point de fusion de la paraffine. Ainsi les coupes sont bien collées sur la lame en verre et prêtes pour la coloration.

Il faut alors procéder au déparaffinage. Cela consiste à retirer la paraffine et à réhydrater l'échantillon inclus en inversant les principales étapes de l'inclusion. Les coupes sont d'abord plongées dans un solvant de la paraffine (du toluène), éliminé par la suite avec des bains d'alcool de degré décroissant, et enfin placées dans de l'eau. Différentes colorations sont alors envisageables. La coloration pendant 5 minutes à l'hémalum de Gabe est très courante. Des colorations à l'éosine vert-lumière et au picrosirius ont également été réalisées.

Dans tous les cas, les coupes colorées sont à nouveau déshydratées dans des bains d'alcool puis plongées dans deux bains de toluène d'une durée de 5 minutes chacun. Enfin, pour l'observation, les coupes sont montées entre lame et lamelle.

La Figure 2-24 présente un exemple de coupe histologique d'une matrice avec des cellules à la surface:



Figure 2-24 : Coupe histologique d'une matrice avec cellules à la surface observée au microscope. On voit notamment l'épithélium stratifié à la surface de la matrice.

2.5 Conclusion

L'objectif de ce travail est de créer une matrice transparente à base de collagène qui soit organisée d'une manière similaire à celle de la cornée en faisant usage des propriétés mésogènes des molécules de collagène. L'ensemble des techniques présentées dans ce chapitre nous a permis de caractériser avec précision les phases cristal-liquides et les matrices synthétisées (microstructure, transparence, propriétés mécaniques). C'est l'utilisation de toutes ces techniques qui nous ont permis d'élaborer, et cibler les meilleures conditions. Ainsi, nous avons testé plusieurs conditions physico-chimiques et les phases cristal-liquides générées permettant d'avoir des matrices transparentes ont été analysées grâce à la microscopie à lumière polarisée et à la SHG. La rhéologie nous a permis de déceler des différences dans le comportement mécanique de conditions physico-chimiques particulières. La microscopie électronique a été utilisée pour étudier les phases cristal-liquides stabilisées par fibrillogenèse et la structure des matrices de type cornée. Les techniques de culture cellulaire ont permis de vérifier le comportement de plusieurs types cellulaires de la cornée sur nos matrices. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3
CARACTERISATION DES PHASES
CRISTAL-LIQUIDES

3 Caractérisation des phases cristal-liquides

L'objectif est d'utiliser les propriétés cristal-liquides du collagène pour retrouver une phase dans laquelle les molécules sont organisées de la même façon que les fibrilles dans la cornée. Il s'agit donc de trouver les conditions physico-chimiques qui fournissent une phase cristal-liquide en contreplaqué qui pourra être stabilisée par fibrillogenèse, afin d'obtenir une matrice organisée. Nous avons donc observé, grâce au système des microcellules présenté dans le chapitre précédent, les phases cristal-liquides obtenues pour différentes conditions physico-chimiques. En réalité, seules les conditions offrant des matrices transparentes ont été testées. Les microcellules ont d'abord été observées sous lumière polarisée ce qui a permis de déterminer les conditions les plus intéressantes pour le projet. La phase cristal-liquide sélectionnée a ensuite été plus précisément caractérisée par génération de second harmonique et par cryo-SEM-FEG. Enfin, pour vérifier que l'organisation de la phase cristal-liquide est conservée lors de la fibrillogenèse, des observations en microscopie photonique et électronique ont été faites sur coupes semi-fines et ultra-fines.

3.1 Protocole expérimental

Les solutions injectées dans les microcellules ont une concentration initiale de 0,3 ou 3 mg/mL suivant les expériences. En général, mais cela varie avec la concentration initiale d'injection, il faut 3 à 4 jours avant d'observer la formation de la phase cristal-liquide sur les bords de la microcellule là où la solution est la plus concentrée. Une fois la microcellule remplie (Figure 3-1), la vitesse d'injection de la solution reste généralement la même tout au long de l'expérience.

Cependant, il arrive qu'il soit nécessaire de la modifier si la microcellule dessèche ou déborde légèrement. Les microcellules sont maintenues dans une pièce climatisée où la température est maintenue à 20°C.

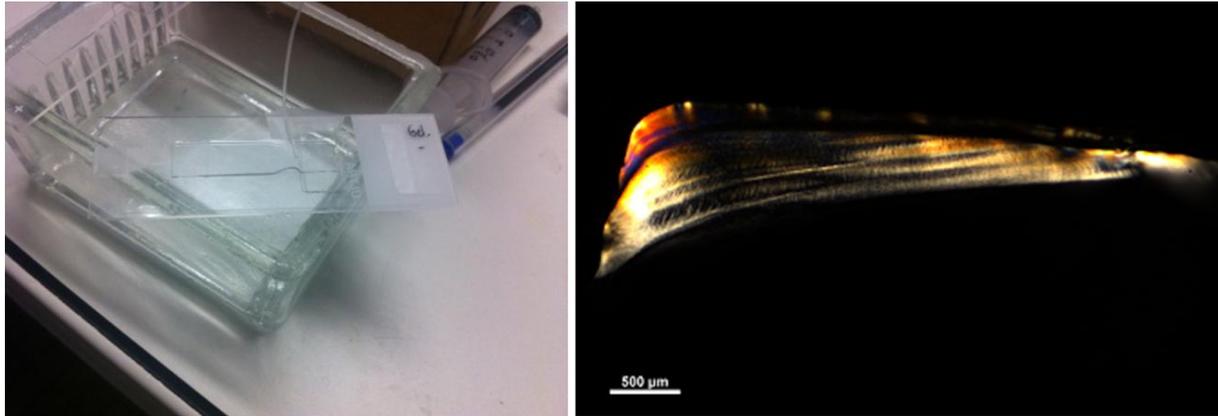


Figure 3-1 : (a) Photo d'une microcellule en cours de remplissage. (b) Image en lumière polarisée (objectif x10) montrant l'apparition de la phase cristal-liquide sur un des bords de la microcellule. La zone noire correspond à une zone où la solution de collagène n'est pas assez concentrée pour s'organiser en phase cristal-liquide.

3.1.1 Conditions analysées

Le Tableau 3-1 présente les différentes conditions étudiées et les techniques avec lesquelles elles ont été spécifiquement analysées.

| Condition n° | c(AA) mM | c(HCl) mM | pH | Lumière Polarisée | SHG | Cryo SEM-FEG |
|--------------|-------------|--------------|------|----------------------|-----|-----------------|
| 23 | 10 | 0,3 | 3,26 | X | X | X |
| 22 | 5 | 0,3 | 3,37 | X | | |
| 24 | 20 | 0,3 | 3,17 | X | | |
| 5 | 36 | 0,6 | 2,91 | X | | |
| 6 | 36 | 0,9 | 2,85 | X | | |
| 7 | 36 | 1,25 | 2,78 | X | | |
| 2 | 120 | 0,3 | 2,85 | X | | |

Tableau 3-1 : Conditions étudiées et présentées dans ce chapitre

3.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons, pour ces conditions physico-chimiques, sont obtenus par dialyse de la solution purifiée. Ensuite, on prélève avec une seringue de 5 mL la solution dialysée. Chaque condition a été testée au minimum 3 fois. Les microcellules ont les mêmes dimensions de sorte que le volume de solution de collagène soit le même dans chaque cas.

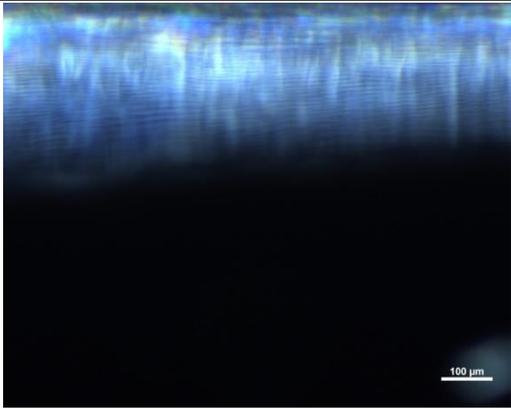
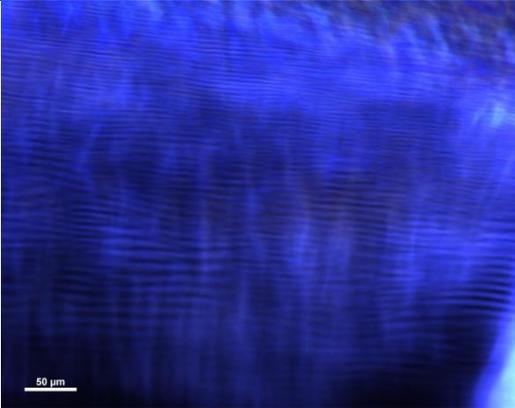
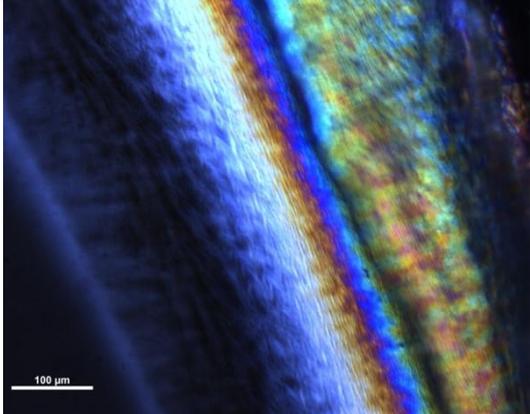
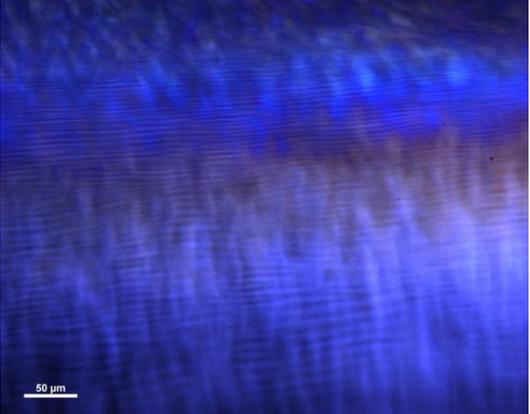
3.2 Analyse par lumière polarisée

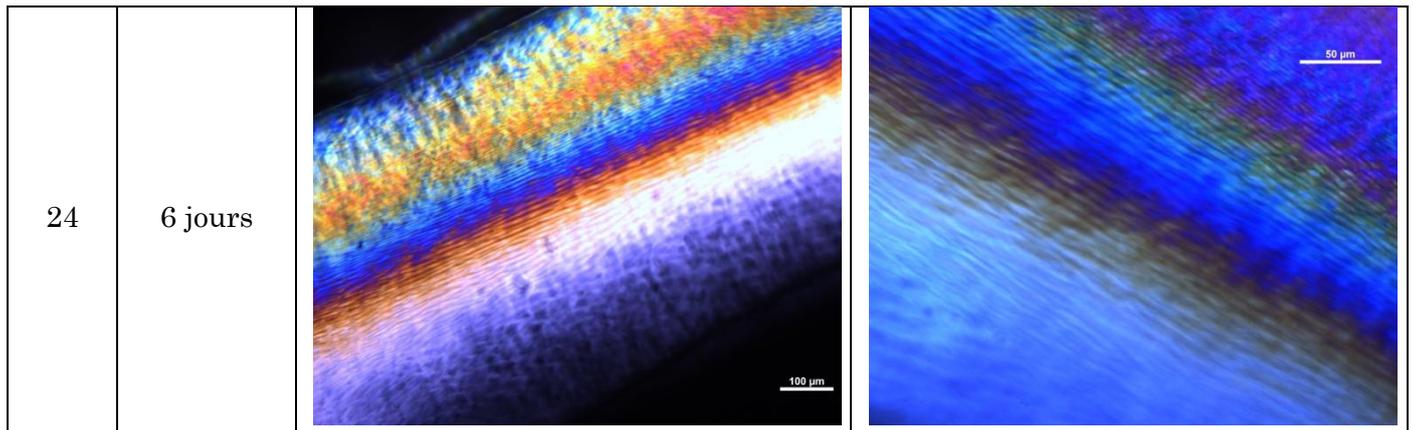
Le microscope à lumière polarisée est la première technique pour caractériser les phases cristal-liquides générées par chaque condition physico-chimique. Cette technique permet

de visualiser l'organisation des molécules de collagène et donc de faire le tri entre les conditions donnant des phases cholestériques et celle(s) se rapprochant du contreplaqué du stroma de la cornée. Les phases cristal-liquides ont été étudiées pour les conditions fournissant des matrices fibrillées transparentes qui seront présentées dans le chapitre suivant.

3.2.1 Imagerie en lumière polarisée

L'imagerie se fait tout en maintenant l'injection de collagène de sorte à ne pas trop perturber le système, et à éviter l'évaporation pendant l'observation. Il faut suivre chaque jour l'évolution de la phase car, au début, le collagène n'est pas assez concentré alors qu'au bout de 7-8 jours, il y a un risque de séchage de la solution qui devient trop concentrée. Le Tableau 3-2 présente ces résultats.

| N | Temps de traitement | Image 1 (x20) | Image 2 (x40) |
|----|---------------------|---|--|
| 23 | 5 jours |  |  |
| 22 | 5 jours |  |  |



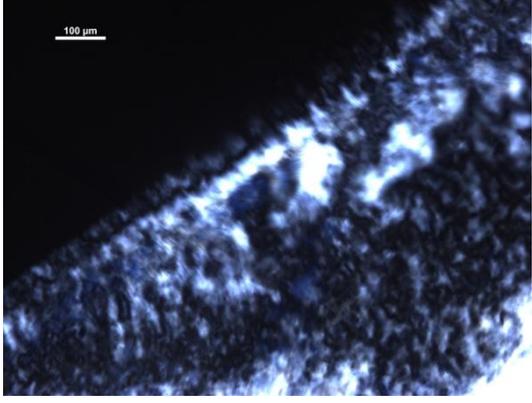
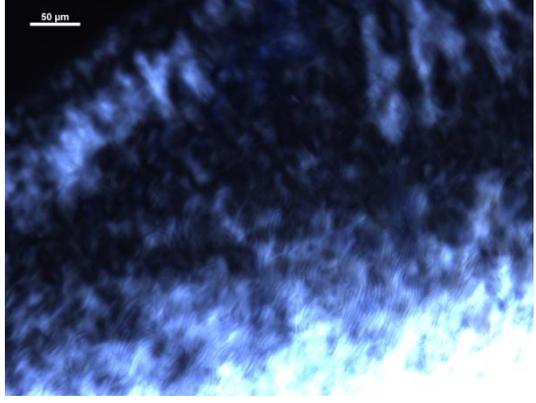
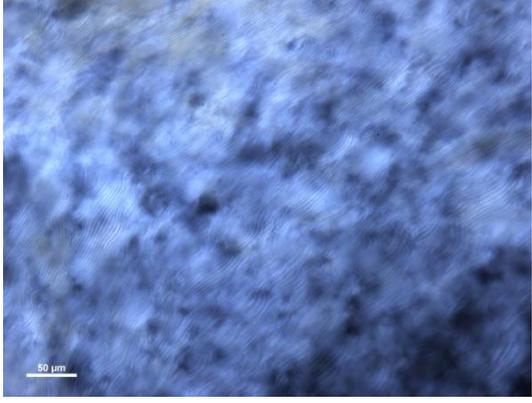
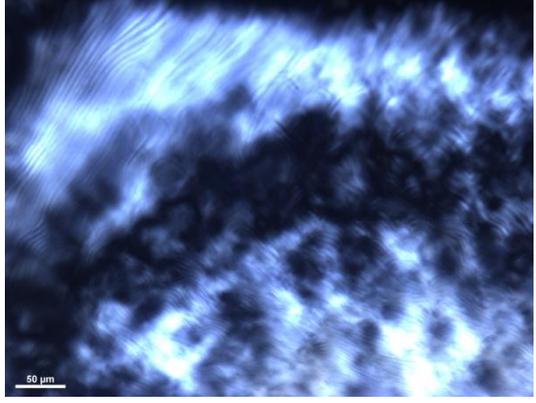
| N | Temps de traitement | Image 1 (x20) | Image 2 (x40) |
|---|---------------------|---|--|
| 2 | 5 jours |  |  |
| 5 | 5 jours |  |  |

Tableau 3-2 : Images en lumière polarisée de phases cristal-liquides de collagène dans des conditions physico-chimiques offrant des matrices transparentes. Dans le cas des conditions 22, 23 et 24 on obtient une phase proche du contreplaqué alors que pour les autres conditions (seules les conditions 2 et 5 sont présentées ici), nous avons observé des phases cholestériques.

3.2.2 Discussion

Comme on le verra dans le chapitre 4, plusieurs conditions physico-chimiques permettent d'obtenir des matrices très transparentes. Ces matrices ont une organisation

assez proche de celle formée par les molécules de collagène dans la phase cristal-liquide, ceci sera discuté dans le chapitre suivant. L'obtention de matrices transparentes laissait supposer que la phase cristal-liquide mise en place lors de la concentration de la solution était en contreplaqué. En effet, la transparence de la cornée est souvent attribuée, en partie, à l'organisation spécifique en contreplaqué des fibrilles. Or, il apparaît ici que les conditions fournissant des matrices transparentes ne donnent pas toutes des phases cristal-liquides en contreplaqué. Les conditions 2, 5, 6 et 7 donnent des matrices bien transparentes, mais des phases cristal-liquides cholestériques.

Les conditions 22, 23 et 24 avec respectivement 10, 5 et 20 mM d'acide acétique (et 0,3 mM d'HCl) fournissent des phases cristal-liquides en contreplaqué avec une alternance brutale de bandes brillantes et sombres suggérant la présence d'angles importants entre deux couches de molécules. La condition 23 semblait être la mieux organisée des trois, la phase s'étendant sur pratiquement toute la longueur des microcellules. Le pas du contre plaqué dans cette condition varie avec la concentration (ce qui est analysé grâce à la microscopie à deux photons). Mais, on voit qu'en général le demi-pas varie de 2 à 4 μm , 4 μm étant le demi-pas dans les zones les plus diluées.

Il apparaît aussi que le pH a une incidence sur l'organisation des molécules. Le pH des conditions 2, 5, 6 et 7 est inférieur à 3. Or les pH des conditions 22, 23 et 24 sont respectivement 3,37, 3,26 et 3,17. Nous avons aussi obtenu une organisation en contreplaqué (mais moins nette) pour la condition 25 de pH égale à 3,45. Ainsi il apparaît que les conditions de pH supérieur à 3 fournissent des phases organisées en contreplaqué et celles inférieures à 3 conduisent à la formation de phases cholestériques.

3.3 Analyse par SHG

L'imagerie SHG ainsi que les calculs et simulations ont été réalisés par Claire Teulon au laboratoire d'Optique et Biosciences (Ecole Polytechnique, CNRS, Inserm)

3.3.1 Introduction

Afin d'imager les phases cristal-liquides, le même système qu'en lumière polarisée a été utilisé sauf que l'injection est coupée et la microcellule placée à l'envers sous l'objectif en immersion dans une goutte d'eau.

La SHG a été utilisée pour caractériser précisément la phase cristal-liquide qui nous a semblé la plus pertinente c'est-à-dire celle dont l'organisation des molécules de collagène rappelle l'organisation des fibrilles dans la cornée (le contreplaqué). Ainsi, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la condition 10 mM acide acétique-0,3 mM acide chlorhydrique qui présente l'organisation en contreplaqué la plus étendue.

La SHG a déjà été utilisée afin de caractériser l'organisation 3D des fibrilles de collagène dans les tissus biologiques (Strupler *et al.*, 2007) et dans les solutions denses de collagène (Deniset-Besseau *et al.*, 2010). Ici il s'agit d'étudier l'organisation des molécules de collagène et non des fibrilles puisque nous sommes en solution acide.

Il faut rappeler ici que la SHG est sensible aux assemblages de molécules non centrosymétriques et que le collagène présente, du fait de ses nombreuses liaisons peptidiques alignées, une hyperpolarisabilité du second ordre non négligeable. La réponse non linéaire d'une liaison peptidique est faible, mais toutes les réponses sont sommées de façon cohérente le long de la triple hélice. Ce même phénomène a lieu au sein des fibrilles ce qui explique le fort signal SHG obtenu lors de l'observation de tissus biologiques formés par du collagène.

Dans les phases cristal-liquides, il est question de solutions concentrées où les molécules sont très bien organisées et alignées à l'échelle micrométrique ce qui permet de détecter, là aussi, un bon signal SHG. Ceci avait déjà été observé par Deniset-Besseau *et al.* (Deniset-Besseau *et al.* , 2010). Nous avons utilisé la SHG résolue en polarisation car elle permet d'obtenir des informations quantitatives relatives à la microstructure 3D de fibrilles dans des tissus biologiques (Gusachenko *et al.*, 2012). Elle est, en effet, très sensible à l'orientation des molécules de collagène. Le système utilisé a été décrit dans le chapitre matériaux et méthodes.

3.3.2 Calculs analytiques et simulations numériques

En utilisant la relation liant le rapport d'anisotropie ρ , l'intensité moyenne I_{mean} , l'angle hors plan ψ et en considérant que le champ électrique incident est dans le plan (XY), il est possible de déterminer analytiquement les signaux P-SHG pour n'importe quelle direction des triples hélices. Les résultats qui en découlent sont présentés dans la Figure 3-2 (tracés en noir) :

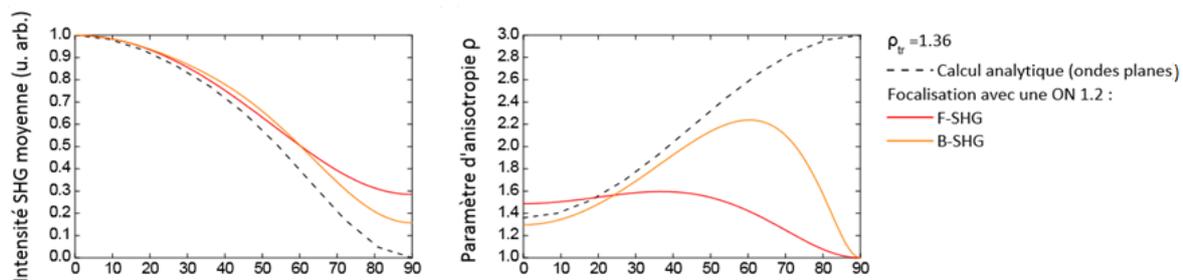


Figure 3-2 : Evolution de I_{mean} et ρ par rapport à l'angle hors plan ψ , soit sans focalisation (tracés noirs en pointillés obtenus par calculs analytiques) ou bien avec une forte focalisation (courbes rouge -SHG à l'avant- et orange -SHG vers l'arrière- obtenues par simulations numériques, NA=1,2). $\rho(\psi)$ est tracé pour $\rho_{tr}=1,36$. (d'après C. Teulon *et al.*, 2016)

Comme cela est suggéré par les équations présentées dans le chapitre 2, le paramètre d'anisotropie augmente et l'intensité moyenne chute quand l'angle hors plan augmente. Néanmoins, les objectifs à grande ouverture numérique entraînent la présence d'un faisceau incident fortement focalisé avec une composante de polarisation axiale. Dans ce cas, les calculs analytiques ne sont plus possibles et c'est là qu'interviennent les simulations numériques. Ces simulations numériques ont été réalisées en utilisant une ouverture numérique de 1,2. Elles montrent que le comportement des deux paramètres ρ et I_{mean} par rapport à l'angle hors plan ψ est semblable à celui obtenu par les calculs analytiques mais avec moins de contraste comme on peut le voir sur la Figure 3-2 en pointillés rouges. La valeur non nulle de l'intensité SHG, pour des triples hélices normales au plan de l'image, est compatible avec la présence d'une composante axiale du champ d'excitation, due à une focalisation intense. La baisse de la valeur du paramètre d'anisotropie pour des angles hors plan importants est également attribuée à cette intense focalisation. Celle-ci a tendance à diminuer le contraste de la SHG en polarisation.

Cette approche est valable si l'on se place dans le cas d'un milieu homogène où toutes les triples hélices de collagène pointent dans la même direction avec un angle hors plan ψ . Dans notre cas, le milieu d'étude est une phase cristal-liquide qui n'est pas un milieu homogène, ce qui a plusieurs conséquences sur le signal P-SHG :

- le champ d'excitation peut être modifié en traversant la phase cristal-liquide, ce qui provoque des perturbations au niveau de la polarisation, de la phase et de l'intensité.
- les triples hélices de collagène peuvent présenter plusieurs orientations au sein même du volume d'excitation, ce qui provoque des modifications dans le tenseur de susceptibilité.

Cependant, la complexité des changements à prendre en compte étant trop importante, on considèrera le cas simplifié d'un milieu homogène.

3.3.3 Résultats numériques et expérimentaux

3.3.3.1 Calculs des images P-SHG pour une structure en contreplaqué

Comme nous l'avons précisé précédemment, le collagène s'organise en phase cristal-liquide sur les bords de la microcellule, à proximité de l'interface air-liquide où la concentration est la plus élevée. La condition physico-chimique utilisée dans nos expériences fournit une organisation nématique contreplaquée des triples hélices, comme celle des fibrilles dans la cornée et comme cela est illustré dans la Figure 3-3.

Cette phase cristal-liquide est composée de couches de quelques micromètres d'épaisseur qui contiennent des triples hélices alignées dans la même direction (flèches rouges en Figure 3-3) au sein d'une même couche. Deux couches adjacentes ont des triples hélices

alignées dans des directions perpendiculaires. L'axe autour duquel tournent les couches, appelé axe directeur, est représenté en orange et on suppose qu'il est dans le plan (XZ) pour des raisons de simplification. Ainsi, seuls deux paramètres sont nécessaires pour décrire la phase cristal-liquide dans le repère fixe (XYZ) :

- l'angle hors plan α entre l'axe directeur et le plan (XY) de l'image
- les deux directions possibles des triples hélices dans les couches qui sont décrites par un unique angle β puisqu'elles sont perpendiculaires. β est égal à 0 lorsqu'une couche est orientée selon l'axe Y. On considère également que les molécules de collagène ont la même polarité au sein d'une couche de sorte que β est compris entre 0 et 90°.

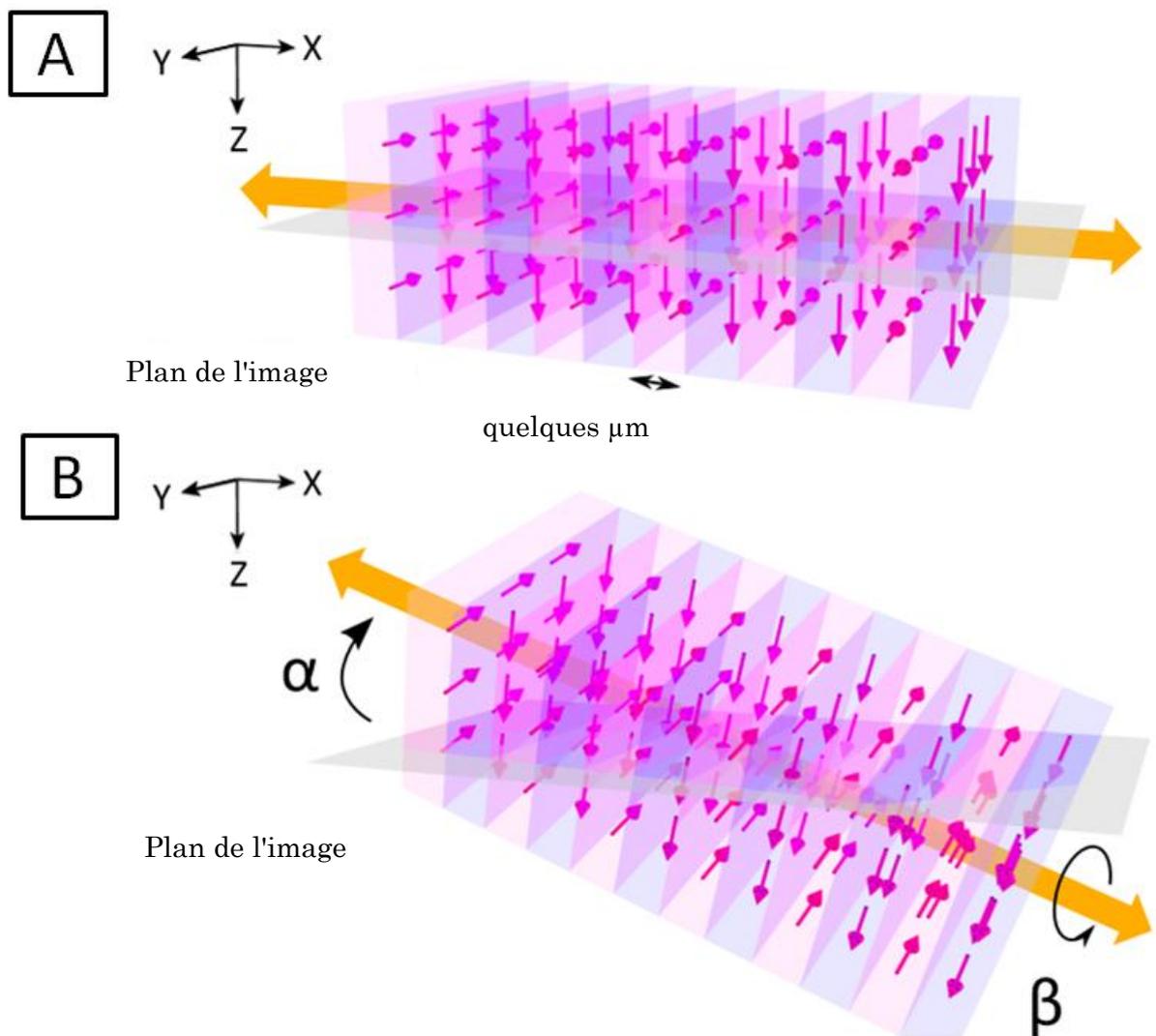


Figure 3-3 : Organisation en contreplaqué (Plywood-like). Cette structure est composée de couches de quelques μm de triples hélices alignées dans une même direction (flèches rouges). Deux couches consécutives ont des directions perpendiculaires. L'axe directeur, en orange, est perpendiculaire aux couches. On suppose que cet axe est contenu dans le plan (XZ) de sorte à avoir des angles centrés autour de 90°. (a) C'est le cas le plus simple avec l'axe directeur selon X et les directions des couches suivant Y et Z. (b) deux angles sont nécessaires pour décrire l'orientation 3D : l'angle α que fait l'axe directeur par rapport au plan de l'image, et l'angle β qui est l'angle que font les couches par rapport à cet axe ($\beta=0$ quand une couche est selon Y). (C. Teulon *et al.*, 2016)

Ainsi, les mesures résolues en polarisation dépendent de l'orientation des triple hélices dans le repère du laboratoire (XYZ), décrite par (ρ, ψ) c'est-à-dire comment le contreplaqué, décrit par (α, β) est orienté par rapport à (XYZ). Le contreplaqué peut être orienté dans n'importe quelle direction par rapport à l'interface air-liquide. En pratique, les couches sont très rarement parallèles à cette interface. Elles semblent plutôt parallèles au front de même concentration. En effet, il a toujours été observé, grâce aux images 3D dans l'épaisseur de la microcellule, que l'axe directeur était incliné d'un angle α par rapport à l'interface air-liquide.

Claire Teulon a réalisé des calculs analytiques en utilisant les équations présentées précédemment pour relier les trois paramètres mesurés par P-SHG, ρ , φ et I_{mean} , à l'orientation du contreplaqué (α, β) et, ceci, en l'absence de focalisation (Teulon et al., 2016). Ces résultats sont présentés dans la Figure 3-4 ci-dessous :

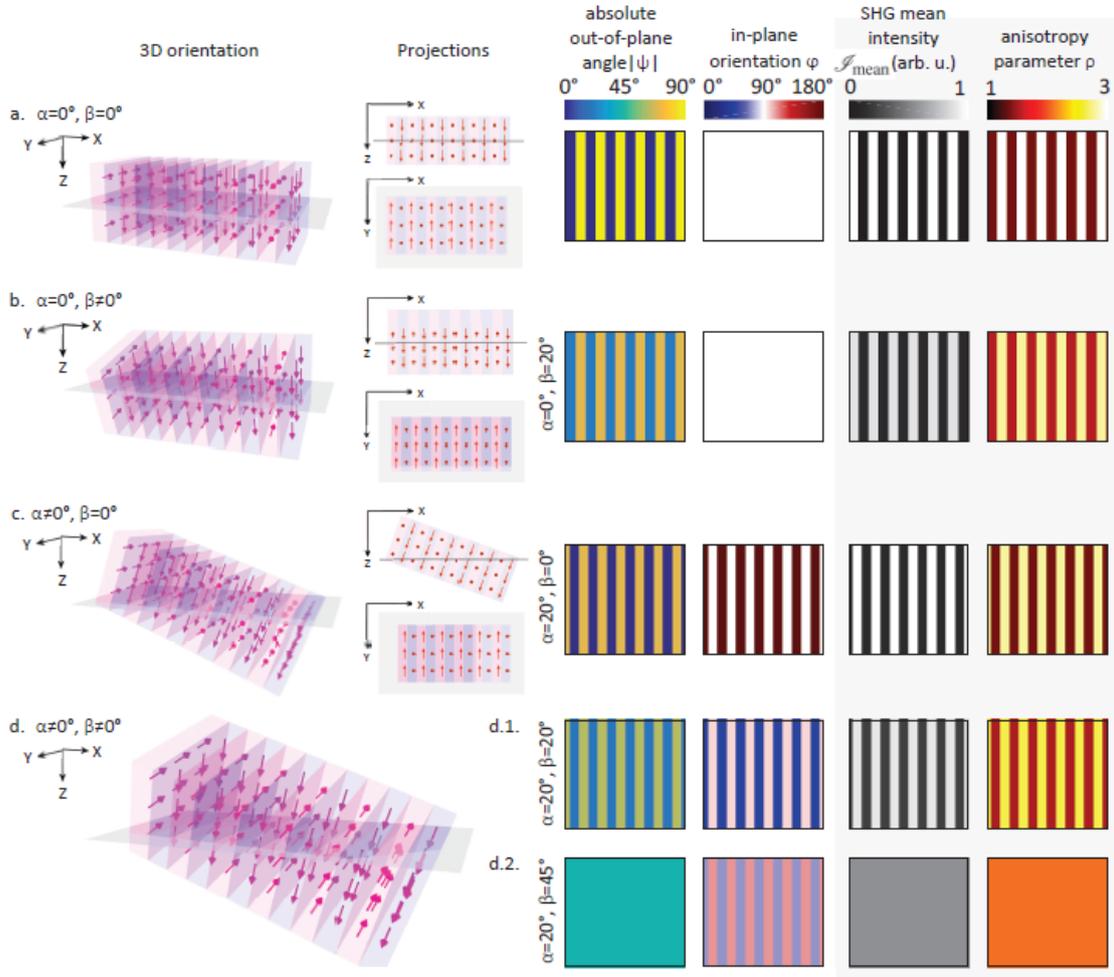


Figure 3-4 : Images P-SHG théoriques obtenues à partir des calculs analytiques pour diverses orientations de la structure en contreplaqué : (a) $\alpha=0^\circ$ et $\beta=0^\circ$, (b) $\alpha=0^\circ$ et $\beta=20^\circ$, (c) $\alpha=20^\circ$ et $\beta=0^\circ$, (d) cas particulier $\alpha=20^\circ$ et $\beta=45^\circ$. Pour les trois premières orientations (a, b, c) les projections sont représentées dans le plan de l'image (XY) et dans le plan (XZ). Pour les deux dernières (d1 et d2) les projections ne sont pas dans le même plan et ne peuvent donc pas être représentées. Ici, l'angle φ est défini par rapport à l'axe X . La comparaison des orientations pour un même angle α , c'est-à-dire (a) et (b) ou (c) et (d) montre que les trois paramètres d'intérêts ont moins de contraste quand $\beta \neq 0^\circ$. (Tiré de C. Teulon *et al.*, 2016)

Nous allons décrire ci-dessous chacune de ces figures :

Fig. 3-4a : C'est le cas le plus simple avec $\alpha=0^\circ$ et $\beta=0^\circ$. Les triples hélices sont soit dans le plan de l'image, soit perpendiculaires à ce plan. Les calculs analytiques montrent que :

- L'orientation φ dans le plan de l'image est la même partout
- L'intensité moyenne présente des franges d'intensité : les maxima ($I_{mean}=1$) correspondent aux couches où les triple hélices sont dans le plan et les minima ($I_{mean}=0$) aux couches perpendiculaires au plan de l'image.
- Le paramètre d'anisotropie a un comportement similaire : $\rho=\rho_{tr}=1,36$ quand les triple hélices sont dans le plan et $\rho=3$ quand elles sont perpendiculaires au plan de l'image.

Fig. 3-4b Si $\alpha=0^\circ$ et $\beta \neq 0$, on observe le même type d'image mais avec légèrement moins de contraste : ρ passe de 1,55 à 2,81 et I_{mean} de 0,12 à 0,88.

Fig. 3-4c Si $\alpha \neq 0$ et dans le cas le plus simple où $\beta=0^\circ$ les calculs analytiques montrent que :

- L'intensité moyenne présente des franges comme précédemment.
- L'anisotropie ρ évolue d'une façon similaire avec moins de contraste.
- L'orientation φ , dans le plan de l'image, oscille également.

Fig. 3-4d Avec $\alpha \neq 0$ et $\beta \neq 0$, le même type d'image est observé, avec toujours moins de contraste. Dans le cas particulier où $\beta=45^\circ$, ρ et I_{mean} ne sont pas contrastés puisque les triple hélices ont le même angle hors plan ψ dans toutes les couches. Dans le cas d'une forte focalisation, on s'attend à avoir encore moins de contraste pour ρ et I_{mean} , comme on a pu le voir dans la Figure 3-2.

3.3.3.2 Résultats expérimentaux

Images en intensité

Les résultats obtenus en microcellules se sont montrés très reproductibles. En effet, la Figure 3-5 montre les images en intensité obtenues sur 11 microcellules différentes. Le motif en contreplaqué est retrouvé à chaque fois avec des pas généralement compris entre 2 et 4 μm et en fonction de la concentration de la zone observée.

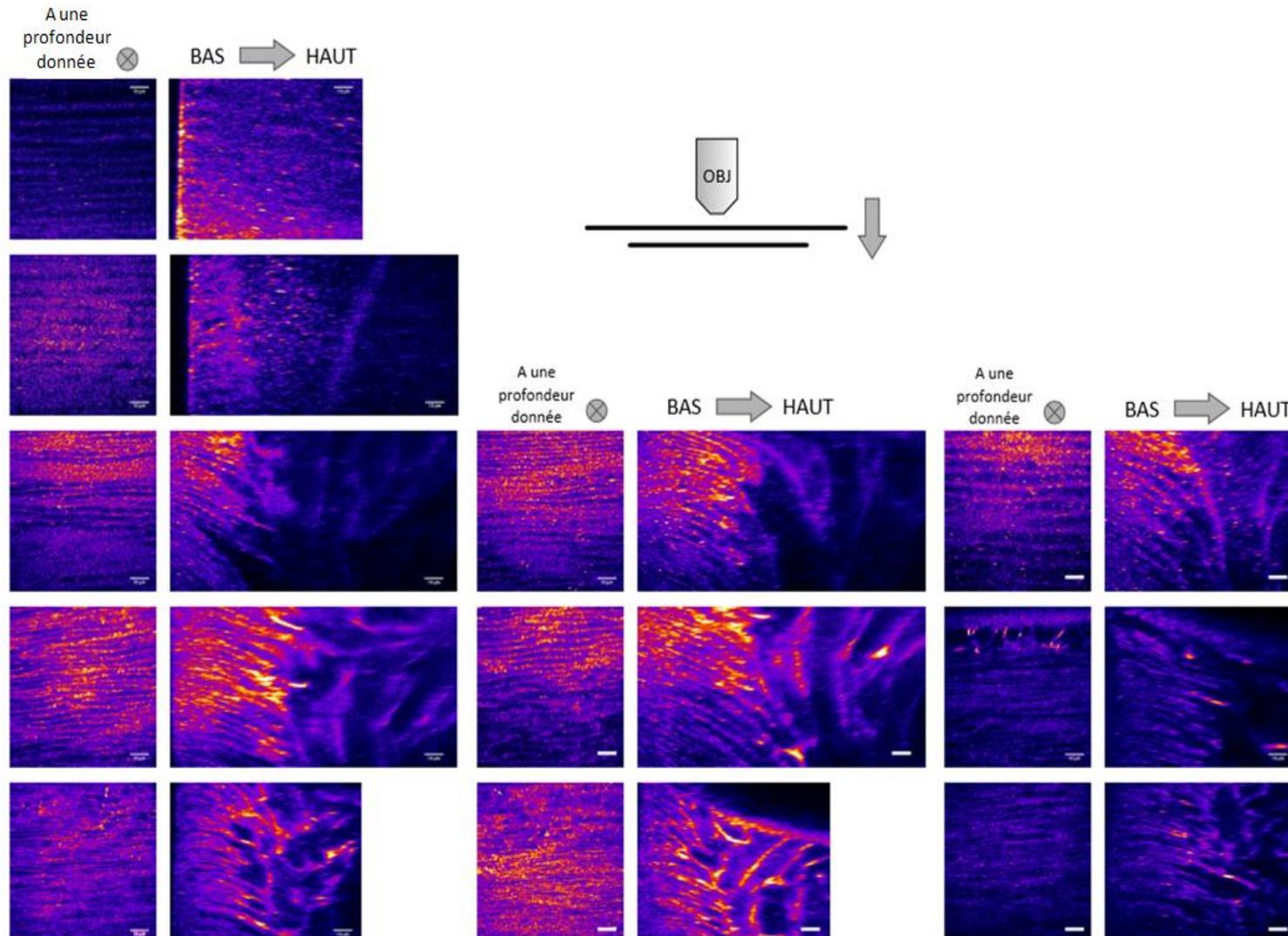


Figure 3-5 : Images des zones organisées dans l'épaisseur de 11 microcellules différentes (barre d'échelle 10 μm). On observe à gauche les images à une profondeur donnée présentant une organisation. Sur la droite on observe les coupes transversales. L'épaisseur de la zone organisée est de quelques dizaines de μm .

On s'aperçoit que l'organisation ne se met pas en place sur toute l'épaisseur des microcellules. En réalité, l'épaisseur de la zone organisée est de quelques dizaines de micromètres et l'organisation prend son origine sur la base de la microcellule.

Il est possible de réaliser un graphe reliant l'intensité SHG en fonction de la distance dans la zone organisée. Sur la Figure 3-6, la zone organisée étudiée est marquée par la barre jaune. Le fit de l'intensité SHG en fonction de la distance en μm peut renseigner sur l'organisation. Une phase cholestérique est modélisée par une courbe en \cos^2 ce qui avait été montré par Deniset-Besseau *et al.* dans des conditions expérimentales différentes (Deniset-Besseau *et al.*, 2010). C'est aussi ce que montre le calcul. Ici, comme dans un autre cas obtenu par Peixoto *et al.* (Peixoto *et al.*, 2010), le profil d'intensité est modélisé par un ensemble de Lorentziennes, ce qui semble caractéristique d'une organisation en contreplaqué, les mêmes caractéristiques ayant été trouvées pour la cornée.

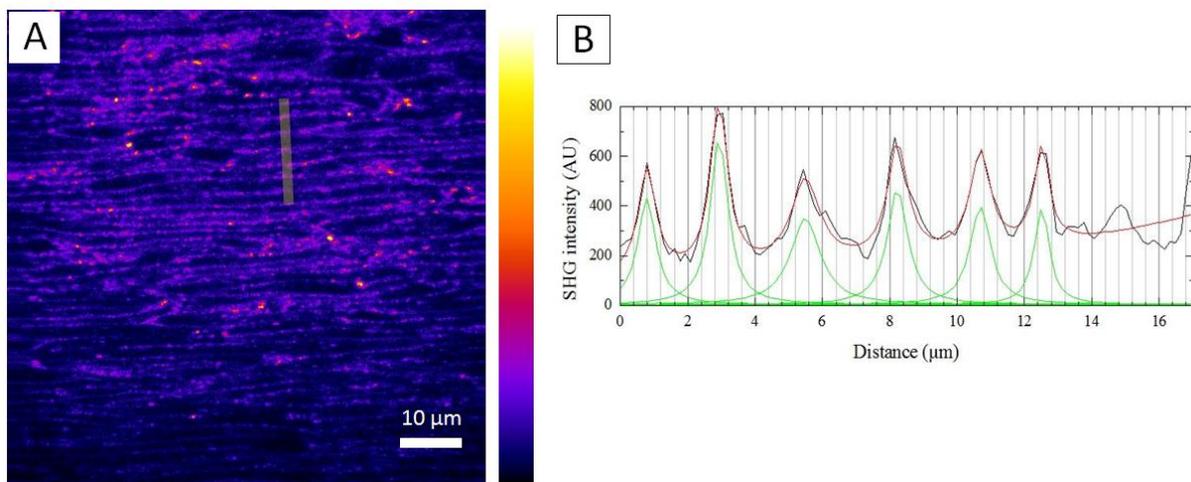


Figure 3-6 : Imagerie multi-photon sur une solution de collagène de condition 23 organisée en microcellule. En A on voit le signal SHG montrant l'organisation de type contre-plaqué. (B) profil d'intensité de la SHG de la région indiquée en jaune sur (A). En (B) la ligne rouge correspond à un fit par un ensemble de Lorentziennes. En vert on a chaque lorentzienne séparément.

Images en polarisation

Les expériences de P-SHG ont été menées sur 8 microcellules avec la condition 10 mM acide acétique-0.3 mM acide chlorhydrique. La concentration en collagène est suivie grâce au signal 2PEF comme indiqué dans les méthodes. Les expériences ont toujours été reproductibles. Quand les résultats n'étaient pas exploitables, la cause en était un temps d'injection trop court et, de fait, la concentration en collagène n'est pas suffisante pour former des phases cristal-liquides, ou un temps d'injection trop long ce qui entraînait le « séchage » de la solution dans la microcellule.

La Figure 3-7 présente les trois paramètres d'intérêt obtenus par P-SHG pour deux microcellules typiques. Les Figure 3-7 a et b fournissent ces paramètres dans la zone imagée pour chaque microcellule. La Figure 3-7c présente un zoom de la zone entourée

de jaune en Figure 3-7b et les profils de chaque paramètre dans une direction perpendiculaire aux franges (lignes jaunes) sont présentés Figure 3-7d. Le même motif a été observé dans toutes les microcellules, avec différents niveaux de contraste : l'orientation mesurée dans le plan de l'image, φ , varie périodiquement et dans les trois images correspondantes de la même zone, les motifs sont similaires (zoom dans la Figure 3-7c). Il en va de même pour les profils Figure 3-7d. Ceux-ci montrent que les variations de l'intensité SHG moyenne sont corrélées à celles du paramètre d'anisotropie ρ : quand l'intensité est élevée, l'anisotropie est faible.

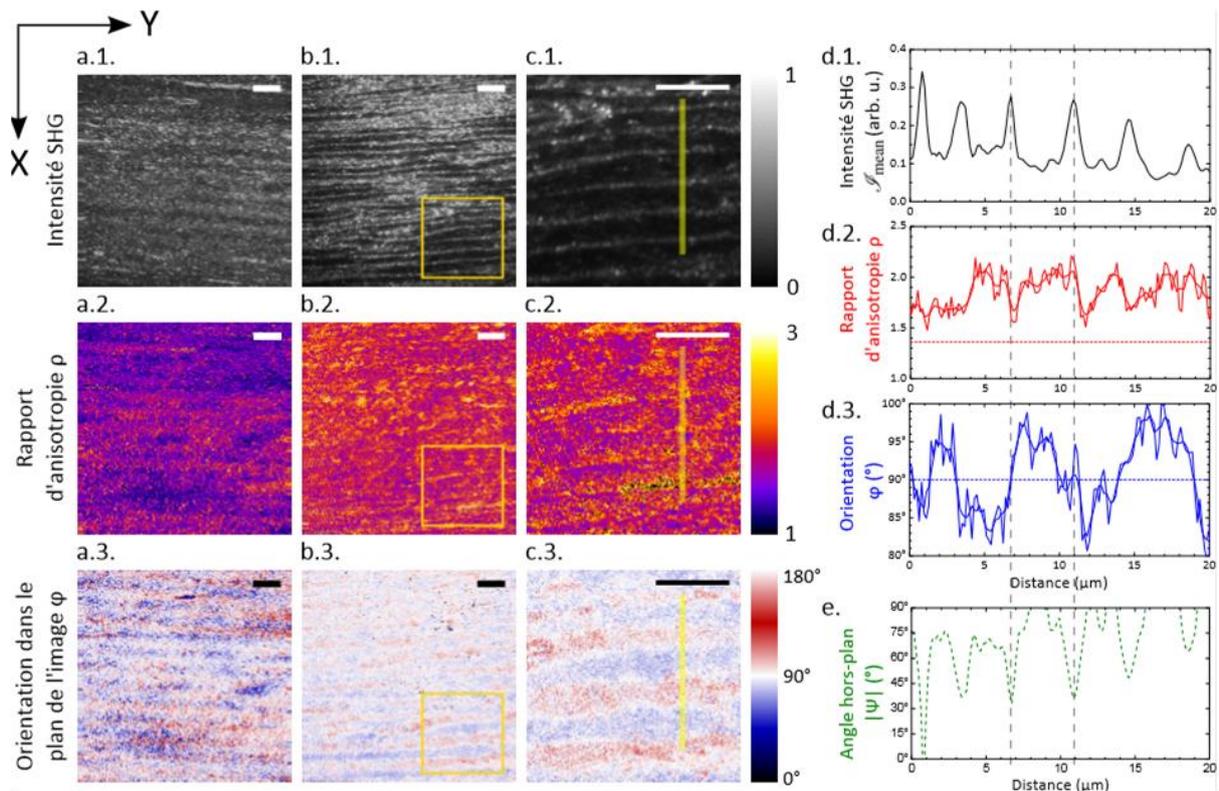


Figure 3-7 : Images P-SHG des phases cristal-liquides du collagène. (a) et (b) regroupement d'images obtenues par P-SHG pour deux microcellules de la même condition physico-chimique (10 mM AA-0,3 mM HCl) conduisant à la formation d'une phase cristal-liquide nématique en contreplaqué. La concentration en collagène a été mesurée par fluorescence excitée à deux photons (2PEF) et était comprise entre 300 et 1000 mg/mL dans les zones observées. Echelle : 10 μm . (c) Images zoomées de la zone entourée en jaune en (b). (d) Profils des trois paramètres P-SHG le long des lignes jaunes tracées en (c). (e) Valeur absolue de l'angle hors plan ψ déduit de I_{mean} et ρ . La réorientation observée montre que les triples hélices tournent autour de l'axe directeur (Tiré de C. Teulon *et al.*, 2016).

Au premier abord, ce motif est cohérent avec les calculs analytiques qui apparaissent sur la droite de la Figure 3-4. L'intensité moyenne et l'anisotropie ont la même périodicité, ce qui est cohérent avec le fait qu'elles dépendent du même paramètre ψ . En outre, comme cela est attendu d'après les simulations numériques et les calculs analytiques, quand l'intensité est élevée, c'est-à-dire quand les triples hélices sont dans le plan de l'image,

l'anisotropie est faible. Ceci fonctionne également dans l'autre sens, c'est à dire avec les triples hélices perpendiculaires au plan de l'image. Par ailleurs, les données fournies par la Figure 3-2 ont été utilisées afin d'extraire la valeur absolue de l'angle hors plan ψ à partir de l'intensité I_{mean} et de l'anisotropie ρ . Les données obtenues par simulation numérique ont été « fittées » afin d'obtenir deux courbes de calibration respectivement pour l'intensité SHG et le paramètre d'anisotropie. Celle concernant le paramètre d'anisotropie a donné deux valeurs absolues différentes. Cette ambiguïté a pu être levée grâce à la valeur relative de l'intensité SHG et le profil résultant se trouve Figure 3-7e. Ce résultat reste cependant qualitatif en raison de certaines incertitudes expérimentales, en particulier l'inhomogénéité et le désordre dans l'échantillon analysé. Néanmoins, tout cela montre clairement que l'angle hors-plan ψ oscille entre deux valeurs, confirmant ainsi que l'orientation des triples hélices tourne par rapport au plan de l'image.

3.3.4 Discussion

Cette étude a permis de montrer l'utilité de la microscopie SHG résolue en polarisation pour déterminer l'organisation spatiale des molécules de collagène. Des calculs analytiques ont été réalisés dans le cas d'une faible focalisation et des simulations numériques dans le cas contraire pour analyser les images P-SHG des phases cristal-liquides en contreplaqué du collagène. Les résultats expérimentaux concordent assez bien avec les résultats théoriques comme le montrent les images zoomées et les profils de la Figure 3-7c et d qui présentent des franges similaires à celles obtenues théoriquement Figure 3-4.

Néanmoins, il y a tout de même quelques différences entre la théorie et les résultats expérimentaux puisque les franges obtenues expérimentalement ne sont pas aussi régulières et les changements pas aussi abrupts que dans le cas théorique. En pratique, les profils en intensité sont mieux représentés par une série de pics Lorentziens que les franges obtenues par simulation (Figure 3-5d). Cela peut s'expliquer par certaines limitations des calculs théoriques qui considèrent un milieu homogène avec des triples hélices alignées dans la même direction et laissent ensuite varier cette direction pour obtenir des données avec différentes orientations. Les expériences, elles, sont réalisées dans une phase cristal-liquide où les couches de molécules ne présentent pas la même orientation. En outre, les simulations numériques ne tiennent pas compte des frontières existantes entre les différentes couches de molécules. Cependant, il est possible d'imaginer ce que cela impliquerait pour le signal P-SHG :

- le champ d'excitation serait modifié en traversant la phase cristal-liquide et par conséquent légèrement perturbé (polarisation, phase et intensité).
- à la frontière entre deux couches, le volume d'excitation pourrait contenir des triples hélices orientées dans différentes directions.

- la frontière peut être inclinée par rapport au plan de l'image.
- dans les calculs on suppose la frontière infiniment petite ce qui n'est sans doute pas le cas. Il faudrait alors considérer une zone de l'espace où les triples hélices de collagène sont désorganisées.

Les frontières, qui sont des zones désorganisées entraînent une baisse de l'intensité SHG et une augmentation de l'anisotropie, induisant les plateaux observés sur les images. La prise en compte des frontières implique, au niveau des calculs analytiques, que l'angle φ soit égal à 90° quand l'intensité est maximale (puisque les triples hélices sont perpendiculaires à l'axe directeur X quand $\psi=0^\circ$) et également qu'il prenne des valeurs supérieures ou inférieures à 90° en fonction de la façon dont les triple hélices changent de direction en passant d'une couche à l'autre. Ceci est observé dans les profils expérimentaux en Figure 3-7d. La plage de variation de l'angle φ est aussi légèrement plus petite qu'avec les profils issus des simulations. Ceci peut être dû soit au fait que l'inclinaison de la phase cristal-liquide est plus faible que celle considérée pour les simulations ou bien que, les zones frontières atténuent la variation mesurée de l'angle φ .

Les profils de l'angle hors plan ψ Figure 3-7e sont cohérents avec les variations de ρ , I_{mean} et φ . En effet, à la frontière entre deux couches de molécules, quand l'intensité est maximale et que ρ diminue (φ est ainsi égal à 90°), ψ tombe également à 0, les triples hélices étant dans le plan de l'image.

Tout en gardant en tête ces limitations, on peut attribuer les profils expérimentaux à une structure en contreplaqué orientée comme dans les cas de la Figure 3-4 c ou d. En effet, les paramètres P-SHG mesurés en Figure 3-7b et c montrent des franges semblables à celles qu'on peut voir Figure 3-4. Cette organisation est retrouvée dans la profondeur en imagerie 3D, même si l'angle φ ne varie pas avec la période attendue (Figure 3-7b.3 et c.3), confirmant l'hypothèse d'une organisation contreplaquée.

Cette étude montre également l'importance de la P-SHG qui rend accessibles des données qu'on ne peut obtenir autrement. En effet, les images de la Figure 3-7a qui illustrent l'intensité SHG moyenne (Figure 3-7a.1) et l'anisotropie (Figure 3-7a.2) n'ont pas le contraste suffisant pour permettre d'identifier une structure en contreplaqué. Les images SHG avec une excitation polarisée circulairement devraient présenter les mêmes limitations, puisqu'elles sont équivalentes à l'intensité SHG moyenne I_{mean} en P-SHG. L'angle φ , obtenu par les mesures P-SHG, montre au contraire des variations (Figure 3-5a.3). On est dans le cas particulier de la Figure 3-7d.2 où la P-SHG est nécessaire pour pouvoir détecter une organisation. Dans ce cas, la SHG classique manquerait la signature d'une structure organisée tel un contreplaqué qui est légèrement incliné par rapport au plan de l'image.

En conclusion, la P-SHG permet de caractériser précisément une organisation cristal-liquide en mesurant des paramètres complémentaires liés à l'orientation dans l'espace des molécules et en particulier l'angle φ qui donne l'orientation dans le plan.

3.4 Analyse par microscopie électronique

3.4.1 Introduction

Les phases cristal-liquide formées dans les microcellules peuvent être stabilisées par fibrillogenèse en plaçant le système sous vapeur d'ammoniaque. Afin de vérifier que les fibrilles ont bien conservé l'organisation des molécules de collagène dans leur phase cristal-liquide, il est possible de préparer le gel comme décrit dans le chapitre matériaux et méthodes pour la microscopie électronique à transmission ou à balayage.

3.4.2 Cryo-SEM FEG

Le cryo-SEM-FEG a été utilisé pour voir l'organisation à une grande échelle des solutions organisées fibrillées de la condition 23 dans les microcellules. La Figure 3-8 montre l'arrangement des fibrilles et, il apparaît que, l'organisation cristal-liquide des triples hélices en contreplaqué est conservée après fibrillogenèse sous vapeurs d'ammoniaque. En effet on voit de larges zones organisées de la même manière que dans la phase cristal-liquide, avec des changements de direction brutaux entre des couches de fibrilles. En haut à droite de la Figure 3-8B, on distingue une zone où les fibrilles sont perpendiculaires à l'image. Un zoom a été fait sur une zone similaire en Figure 3-8D. Le demi-pas est de l'ordre de 2 μm ce qui est en accord avec ce que l'on a observé pour les mêmes micro-cellules en SHG en condition liquide.

3.4.3 Microscopie électronique à transmission

Les microcellules sont préparées pour le TEM comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 2. La Figure 3-9 montre l'organisation des fibrilles dans les microcellules. On remarque l'alternance de zones où les fibrilles sont parallèles entre elles dans le plan de l'image avec des zones où elles sont perpendiculaires au plan de l'image. Le pas du contre plaqué, c'est-à-dire la distance nécessaire pour revenir à une orientation équivalente des fibrilles, n'est pas fixe mais est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, approchant le μm . Or les lamelles de collagène de la cornée ont une épaisseur moyenne de 2 μm . Il faut ici préciser que dans le cas des observations en microscopie électronique, nous n'avons pas le moyen de connaître la concentration en collagène dans la zone observée de la microcellule que nous regardons. La concentration

du collagène varie beaucoup dans ce système et donc le pas du contreplaqué aussi. Une zone concentrée donne un pas plus petit.

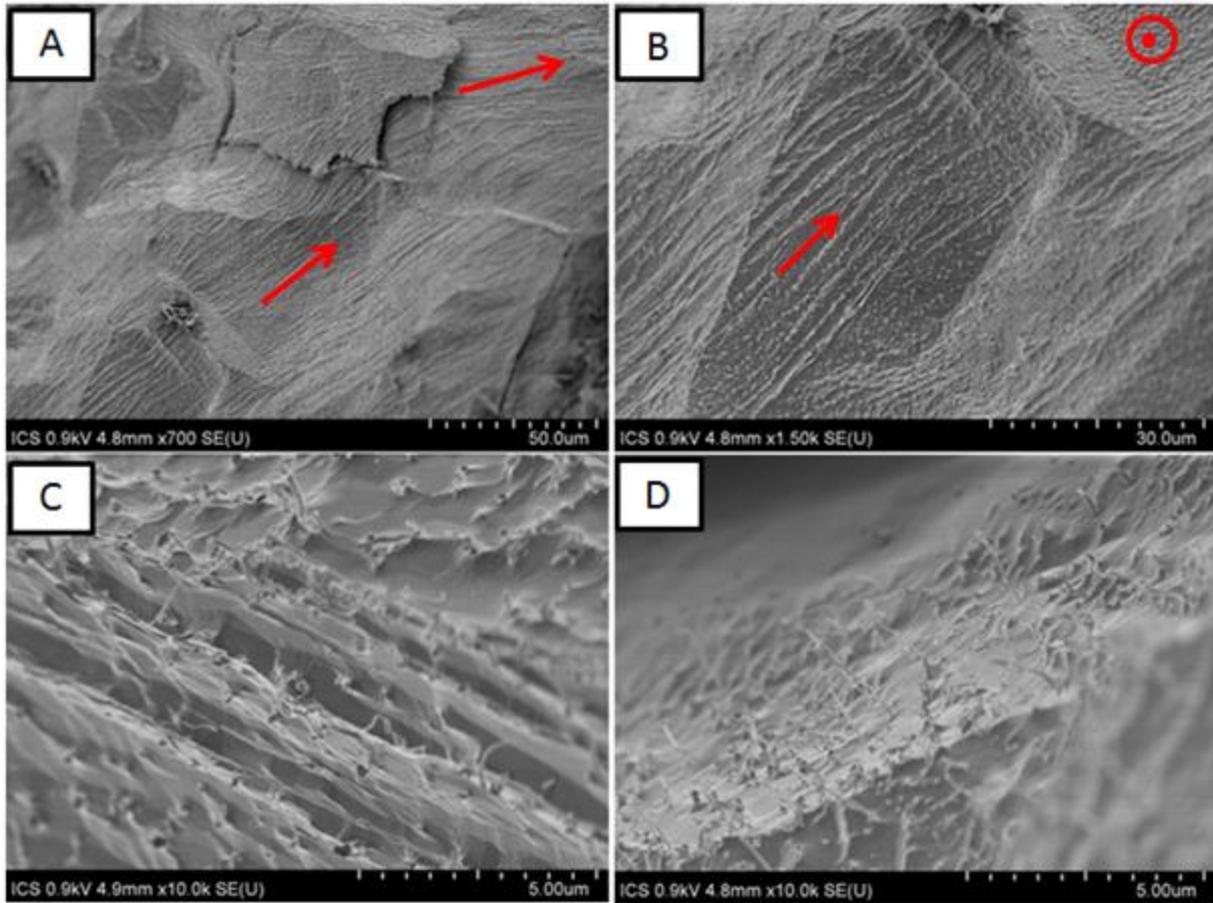


Figure 3-8 : Observation de solutions fibrillées (condition 23) extraites des microcellules et préparées pour le cryo-SEM-FEG. On observe l'organisation des fibrilles dans la microcellule avec des changements de directions clairs (A et B). En C et D on observe des pics qui sont la signature de fibrilles transverses.

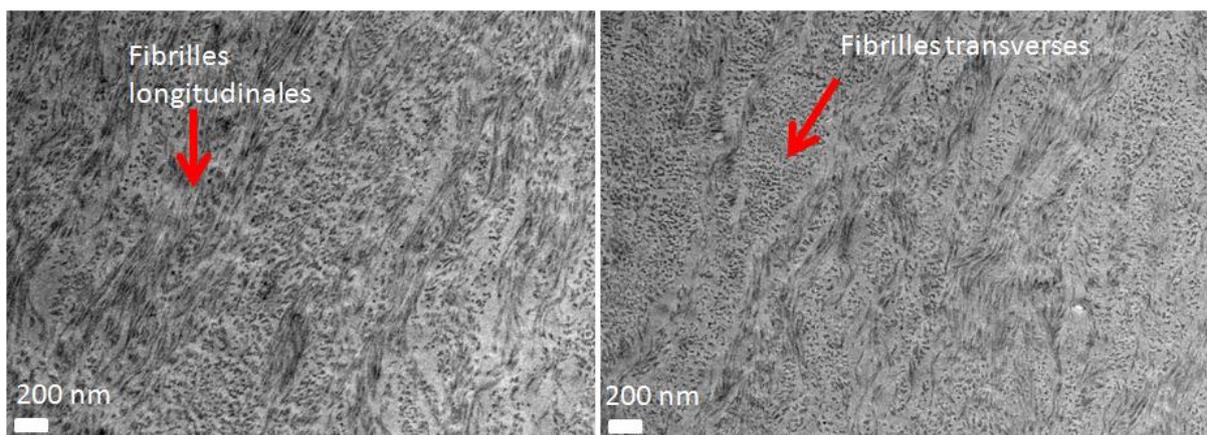


Figure 3-9 : Images TEM de deux microcellules obtenues avec la condition 23. On observe l'alternance de fibrilles parallèles entre elles longitudinalement et de fibrilles perpendiculaires. Les zones de fibrilles parallèles entre elles font environ 200-300 nm de large.

Observation de coupes semi fines

Les coupes semi-fines obtenues à partir des mêmes microcellules montrent également des changements abrupts de direction entre différentes couches de molécules. La Figure 3-10 montre cette alternance très tranchée de zones claires et sombres.

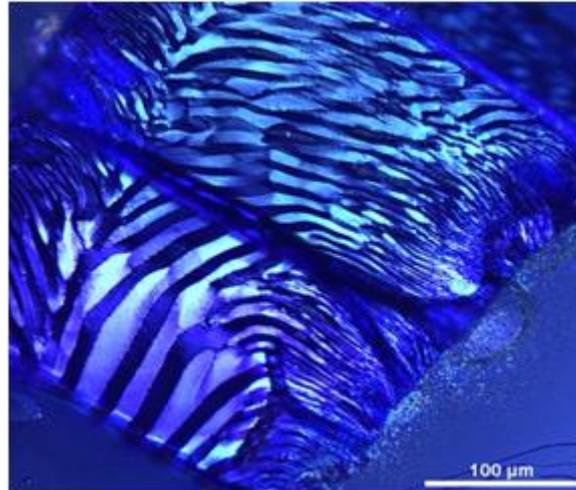


Figure 3-10 : Coupe semi-fine d'une solution (10 mM AA-0,3 mM HCl) de condition 23 fibrillée en microcellule et observée en lumière polarisée.

La microscopie SHG effectuée sur ces mêmes coupes met également en évidence cette structure en contreplaqué comme on peut le voir sur la Figure 3-11.

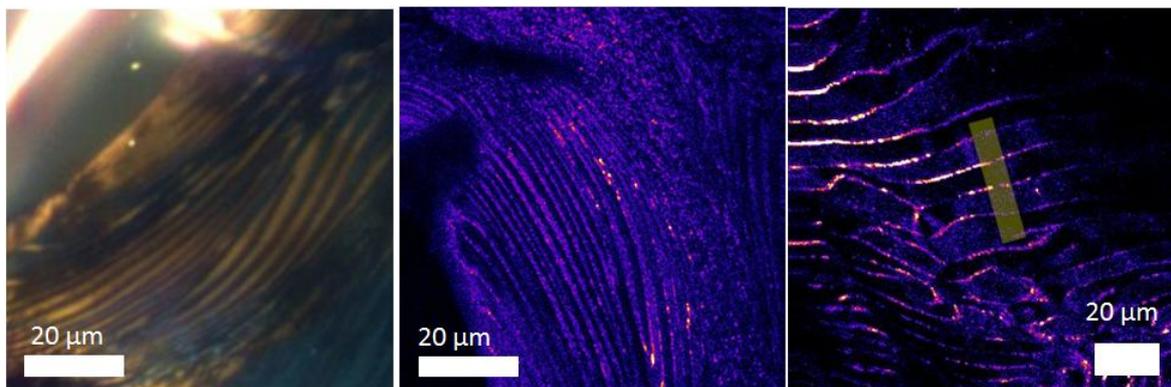


Figure 3-11 : Image en lumière polarisée à gauche et en SHG au centre et à droite pour des coupes semi-fines réalisées à partir de solutions concentrées de condition 23 en microcellules.

Le profil en intensité est donné Figure 3-12 et correspond à la zone délimitée par la barre jaune.

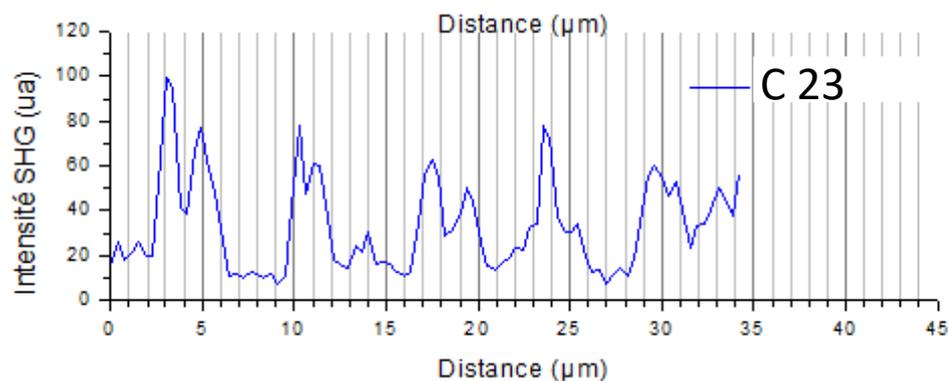


Figure 3-12 : Profil en intensité obtenu avec une coupe semi-fine (condition 23). Le profil est caractérisé par la présence de doubles pics qui se répètent tous les 6,5 µm. La largeur d'un double-pic est elle de 2 µm.

Les solutions dont la phase cristal-liquide est cholestérique donnent en coupe semi-fine des images bien différentes comme on peut le voir sur Figure 3-13.

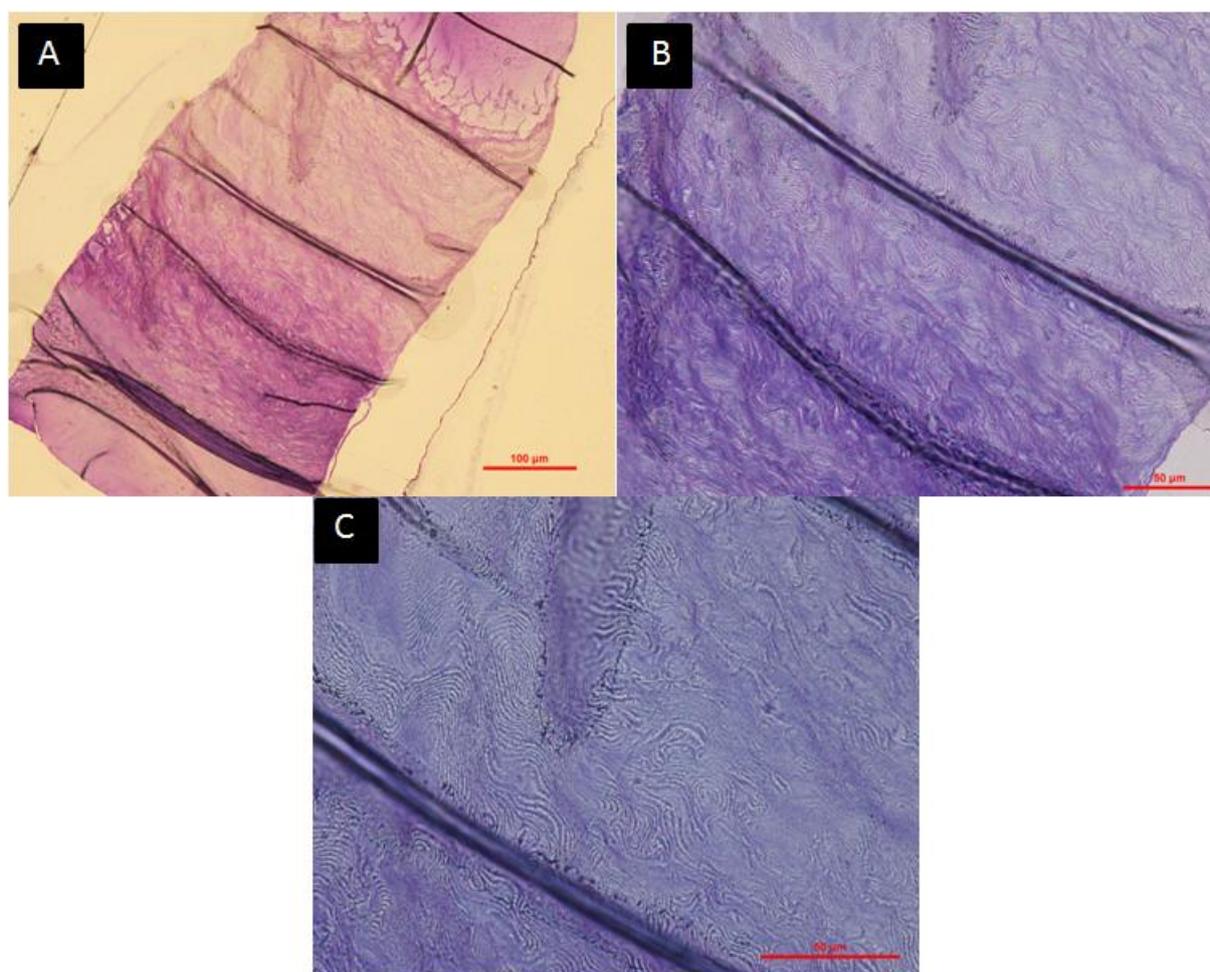


Figure 3-13 : Images à trois grossissements différents de coupes semi-fines réalisées à partir de solutions concentrées en microcellule (condition 5) donnant une organisation cholestérique.

3.5 Caractérisation rhéologique des solutions organisées

Nous nous sommes intéressés, ici, à connaître l'influence de l'organisation cristal-liquide sur les propriétés rhéologiques. En effet, la mesure étant macroscopique, les propriétés mécaniques mesurées par rhéologie sont liés aux arrangements moléculaires pouvant s'étendre sur différentes échelles pour aller jusqu'à la présence des domaines, organisés ou non, et à leur topologie.

Des solutions donnant différentes phases cristal-liquides ont donc été testées en rhéologie à une même concentration de 90 mg/mL. Une solution dans de l'acide acétique 500 mM nous a servi de témoin positif interne, cette condition physico-chimique ayant déjà été caractérisée par Frédéric Gobeaux (2007). La solution dans l'acide acétique 500 mM est directement issue de la purification. Des solutions issues des conditions C1 et C23 ont été préparées à partir de cette même solution et également analysées pour leurs propriétés rhéologiques. Nous rappelons ici que les conditions 500 mM et C1 donnent une organisation cholestérique. Par contre, la solution 500 mM donne une matrice opaque alors que la condition C1 donne une matrice transparente. La condition C23 donne une phase contreplaquée et une matrice transparente, comme vu précédemment.

3.5.1 Conditions donnant une organisation cholestérique

Les figures suivantes présentent les résultats obtenus pour les solutions à 90 mg.mL⁻¹ dans l'acide acétique 500 mM et de condition C1 (70 mM AA, 1,25 HCl).

Condition acide acétique 500mM

La Figure 3-14 montre l'évolution de G' et G'' en fonction de la contrainte, ce qui permet de déterminer le régime linéaire dans lequel la déformation est proportionnelle à la contrainte, et en fonction de la pulsation (à une contrainte fixe, appartenant au régime linéaire).

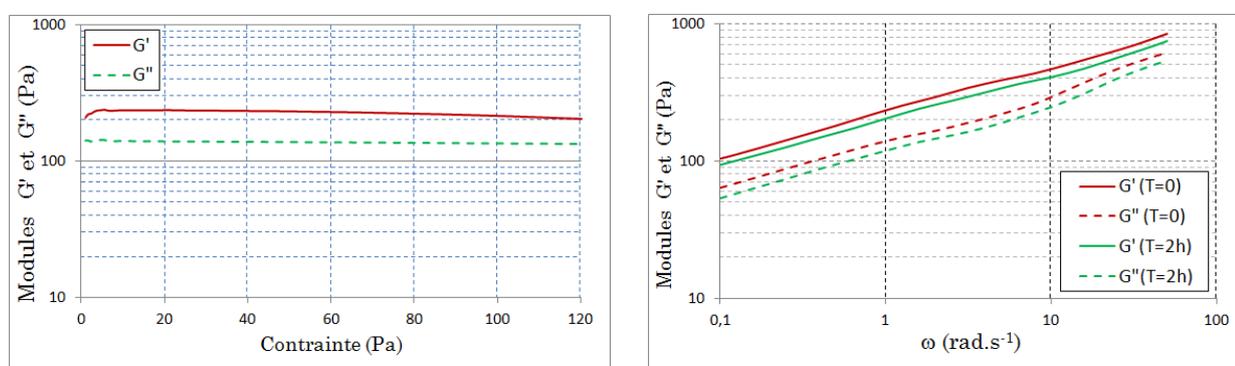


Figure 3-14 : Variation de G' et G'' en fonction de la contrainte (en haut) et variation de G' et G'' en fonction de la fréquence pour un niveau de contrainte de 10 Pa (en bas)

A 10 Pa, pour une fréquence de 1 rad.s⁻¹, le module G' vaut environ 250 Pa ce qui est en accord avec la valeur obtenue précédemment (Gobeaux *et al.*, 2007). On voit également qu'il n'y a pas d'influence notable du temps de relaxation (soit du temps pendant lequel l'échantillon est laissé au repos) puisque les valeurs de G' et G'' après 2 heures de repos sont équivalentes à celles obtenues initialement.

Condition C1

La Figure 3-15 montre l'évolution de G' et G'' , en fonction de la contrainte et de la pulsation. On y voit aussi l'influence du temps de repos sur les valeurs de G' et G'' .

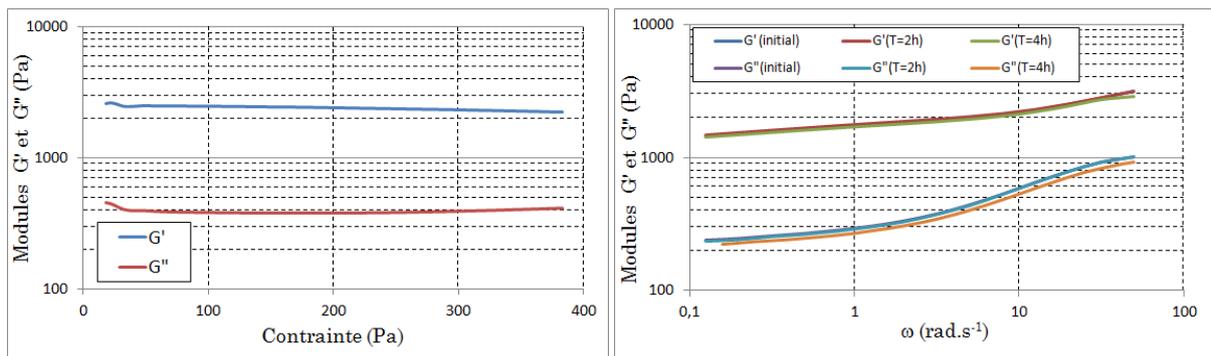


Figure 3-15 : Variation de G' et G'' en fonction de la contrainte (à gauche) et variation de G' et G'' en fonction de la fréquence pour un niveau de contrainte de 10 Pa

L'évolution de G' et G'' pour cette condition apparaît différente. On remarque un changement de pente à 10 rad.s⁻¹ pour G' , les deux parties de cette courbe étant linéaires (en représentation log-log). A 1 rad.s⁻¹, G' vaut un peu de moins de 2000 Pa ce qui est un ordre de grandeur supérieur à la valeur obtenue pour la condition précédente, qui fournit pourtant également une organisation cholestérique. Toujours sur cette représentation log-log, le module G'' présente deux points de rupture de pente, l'un vers 5 rad.s⁻¹, l'autre vers 50 rad.s⁻¹. Comme pour la condition acide acétique 500 mM, le temps de repos n'a pas d'influence sur les valeurs des modules.

3.5.2 Condition 23 : solution organisée en contreplaqué

La Figure 3-16 montre les résultats obtenus pour la condition 23 qui présente une phase cristal-liquide en contreplaqué. On voit notamment l'évolution des modules en fonction de la pulsation à deux contraintes différentes : 10 Pa et 180 Pa. Le régime linéaire est également déterminé et ces résultats montrent que les modules restent similaires sur la plage de contrainte testée.

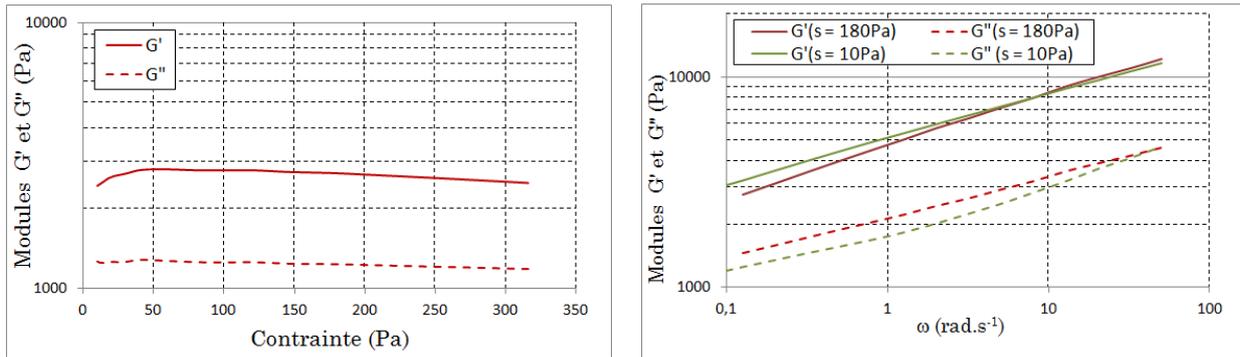


Figure 3-16 A gauche : variation de G' et G'' en fonction de la contrainte. A droite : variation de G' et G'' en fonction de la pulsation ω pour différents niveaux de contrainte, 180 Pa et 10 Pa.

A 1 rad.s⁻¹, pour 10 Pa, la composante G' atteint 5000 Pa, ce qui est largement supérieur (un ordre de grandeur) à la valeur obtenue, dans les mêmes conditions et pour la même concentration, pour la condition acide acétique 500 mM et deux fois plus élevé que pour la condition C1.

La Figure 3-17 montre l'évolution des modules en fonction du temps de relaxation, c'est-à-dire du temps pendant lequel l'échantillon est laissé au repos.

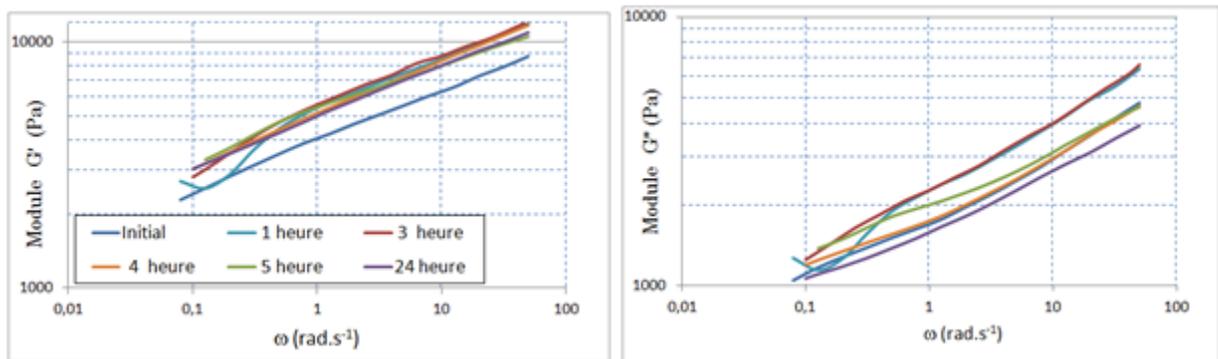


Figure 3-17 : Variation de G' (à gauche) et de G'' (à droite) en fonction du temps de relaxation pour une contrainte de 10 Pa. Les temps indiqués sont les temps depuis la mise en place de l'échantillon.

On remarque que la courbe obtenue initialement pour G' , soit juste après avoir installé l'échantillon, est en dessous des autres. La valeur de G' obtenue après 2 heures est bien supérieure à celle obtenue initialement, mais n'évolue plus après. Cette évolution au cours du temps n'a pas été observée pour les deux autres conditions. L'évolution de G'' est par contre plus chaotique et oscille entre deux pentes, celle définie après 1 heure de pose et celle après 24 heures.

3.5.3 Comparaison des différentes conditions

La Figure 3-18 récapitule les résultats précédents et permet de comparer les différentes conditions testées. Elle présente les évolutions de G' et G'' en fonction de la pulsation ω .

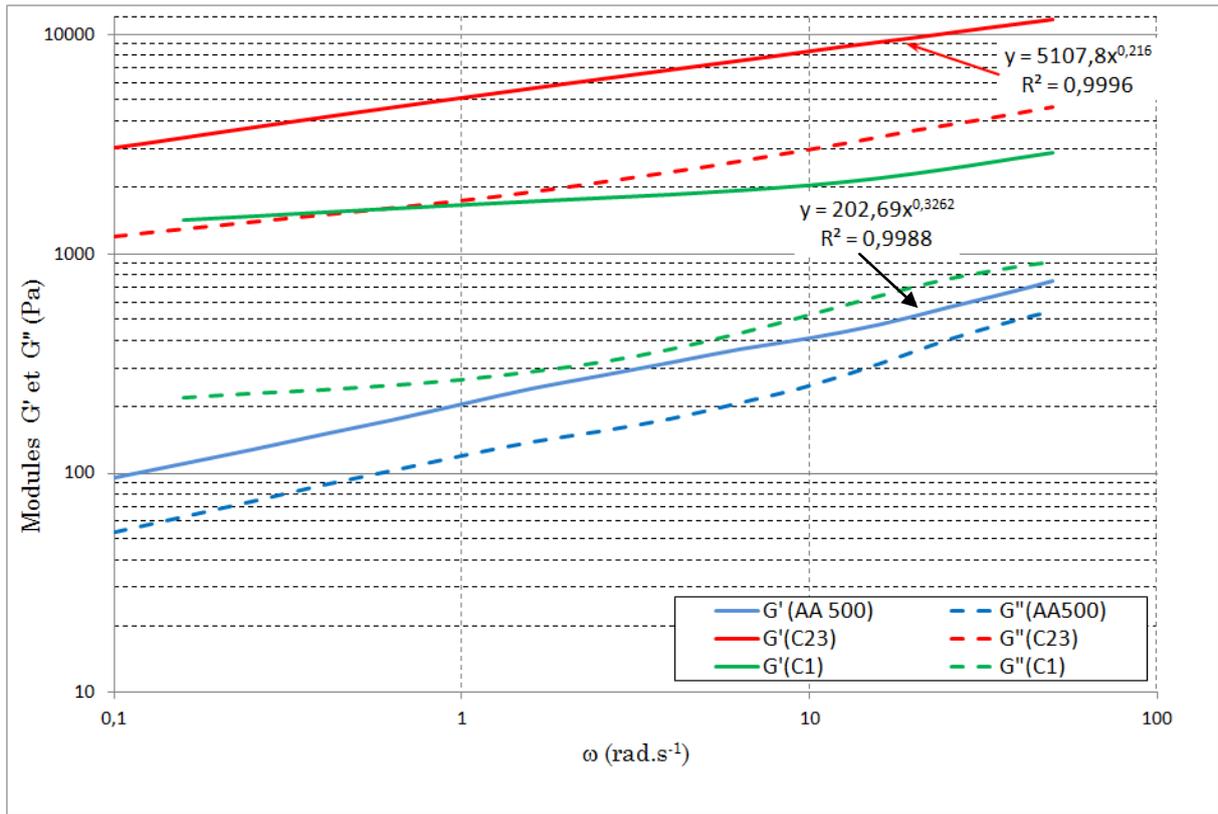


Figure 3-18 : Comparaison des évolutions de G' et G'' pour les trois conditions testées en fonction de la pulsation ω .

Chacun des systèmes analysés suit une évolution en loi puissance (Gobeaux *et al.*, 2010) du type :

$$G'(\omega) = G'_0 \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^\alpha \text{ et } G''(\omega) = G''_0 \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^\beta \quad \text{Équation 3-1}$$

avec $\omega_0 = 1 \text{ rad.s}^{-1}$

Les résultats sont consignés dans le Tableau 3-3 suivant :

| Solution | G'_0 (Pa) | G''_0 (Pa) | α | β |
|-------------|-------------|--------------|----------|---------|
| AA 500 | 202,7 | 119,0 | 0,326 | 0,362 |
| C1 partie 1 | 1671,4 | 270,9 | 0,085 | 0,114 |
| C1 partie 2 | 1160,0 | 226,7 | 0,232 | 0,367 |
| C23 | 5107,8 | 1847,1 | 0,216 | 0,216 |

Tableau 3-3 : Valeurs des pré-facteurs G'_0 et G''_0 , et des puissances α et β selon l'équation 3-6.

On observe que : $G'_0(C23) > G'_0(C1) \gg G'_0(AA500)$. Pour la pulsation $\omega=1 \text{ rad.s}^{-1}$, le pré-facteur $G'_0(C23)$ est environ trois fois plus important que celui de la solution C1.

On constate que pour :

- la solution C23 : les coefficients $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ suivent approximativement la même tendance avec $\alpha=\beta$ et le rapport $\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)}$ est pratiquement constant ($\approx 0,36$).

- la solution AA500 : les coefficients $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ suivent approximativement la même tendance et avec $\beta \gtrsim \alpha$. Notons que si nous évaluons les coefficients sur la partie linéaire (jusqu'à $\omega=10 \text{ rad.s}^{-1}$), le coefficient β est alors égal à 0,324, c'est-à-dire très proche de la valeur de α . Le rapport $\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)}$ est également pratiquement constant ($\approx 0,61$).

- la solution C1 : elle présente deux comportements différents en fonction de la pulsation ω . On peut décomposer chacune des deux courbes en zones limitées par des pulsations indiquant un changement de pente. Il apparaît nettement un changement de pente pour $G'(\omega)$ à $\omega_1 = 1,5 \text{ rad.s}^{-1}$, alors que pour $G''(\omega)$ il se situe à $\omega_2 = 10 \text{ rad.s}^{-1}$ (un second changement de pente, que nous n'interpréterons pas, semble se dessiner à $\omega_2 = 50 \text{ rad.s}^{-1}$ en fin du domaine d'analyse).

Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Gobeaux *et al.*, 2010) conduisent à émettre l'hypothèse que les solutions denses de collagène ont un comportement mécanique similaire à celui des matériaux vitreux mous (*soft glassy material*).

Les matériaux vitreux mous englobent un grand nombre de matériaux (mousses, émulsions, colloïdes ...). Ces matériaux partagent des propriétés rhéologiques dont l'origine physique fait encore l'objet de nombreuses recherches. Les mesures rhéologiques sur les matériaux vitreux-mous présentent une réponse essentiellement élastique dont la forme est de type loi puissance comme nous l'avons indiqué $G'(\omega) = G_0 \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^\alpha$, avec un exposant α tel que : $0 < \alpha < 0,3$, sur quelques décades en fréquence.

En outre, le module de perte $G''(\omega)$ est généralement anormalement élevé dans les basses fréquences, par rapport aux matériaux conventionnels de type élastiques mous. Typiquement, le rapport $\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)}$ est proche de 0,1 sur une large gamme de fréquence.

Il existe peu de modèles qui permettent de décrire le comportement de ces matériaux. Parmi les plus élaborés, on peut citer le modèle phénoménologique de Sollich *et al.*, Sollich (Sollich *et al.*, 1997; Sollich, 1998) sur lesquels s'appuie d'ailleurs les travaux de Gobeaux *et al.* (Gobeaux *et al.*, 2010).

Ce modèle, appelé modèle SGR (pour Soft Glassy Material) s'appuie sur le fait que la structure est désordonnée et métastable. Intuitivement, les éléments de la structure sont "bloqués" énergétiquement dans un puits de potentiel dont la valeur est fixée par les éléments constitutifs plus proches voisins. Cependant un apport énergétique peut permettre à cet élément de quitter ce puits et donc de provoquer un réarrangement. Pour décrire la rhéologie de tels matériaux, il est nécessaire d'introduire une déformation

locale l . Lorsque le système est cisailé, un élément constitutif se déforme élastiquement: l'énergie élastique associée est alors donnée par $E = \frac{1}{2}k \cdot l_y^2$ où k représente une constante analogue à une constante de raideur, et l_y la déformation seuil. Ce réarrangement a lieu par dissipation de l'énergie élastique stockée lorsque la déformation seuil est atteinte. L'effet de désordre est pris en compte en attribuant à chaque élément constitutif une énergie élastique propre (en fait, on parlera de distribution de E). Pour décrire l'état du système, il est alors nécessaire de déterminer la probabilité $P(E, l, t)$ qu'un élément constitutif possède l'énergie E , lorsqu'il est soumis à une déformation l , au temps t . Le terme $P(E, l, t)$ s'exprime comme :

$$\frac{\square P}{\square t} = -\dot{\gamma} \frac{\square P}{\square l} - \Gamma_0 P e^{-\frac{E - k \cdot l^2 / 2}{x}} + \Pi(t, l, E) \quad \text{Équation 3-2}$$

Dans cette expression, $\dot{\gamma}$ est la vitesse de déformation et le terme $\Pi(t, l, E)$ représente un produit de terme faisant intervenir, entre autre, la distribution des puits (proportionnelle à e^{-E}).

Dans ce modèle, l'un des principaux problèmes consiste à donner une interprétation physique aux paramètres du modèle que sont x "noise température" (température de bruit) et Γ_0 "frequency attempt" (que l'on peut définir comme la fréquence d'apparition de saut d'un élément hors de son puits de potentiel). Le paramètre x est donné en unité de $k_B T$ où k_B est la constante de Boltzman et Γ_0 a la dimension d'une fréquence. La grandeur x peut être considérée comme l'énergie d'activation nécessaire au mouvement localisé (dans un intervalle de temps estimé à $1/\Gamma_0$) résultant de l'application d'une contrainte ou d'un mouvement en un point, éloigné dans le matériau, du fait d'une propagation des interactions. Un autre élément important, sur lequel s'appuie ce modèle, est que les matériaux vitreux-mous sont conceptuellement constitués d'un grand nombre de domaines à l'échelle mésoscopiques, c'est-à-dire assez petits pour que l'échantillon étudié en comporte en suffisamment grand nombre, et assez petits pour que les déformations puissent être considéré comme simplement élastiques dans chacun d'eux.

Parmi les principaux résultats, ce modèle permet de prédire l'évolution des modules $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ en fonction de la pulsation ω comme le montre la Figure 3-19 (Sollich *et al.*, 1997).

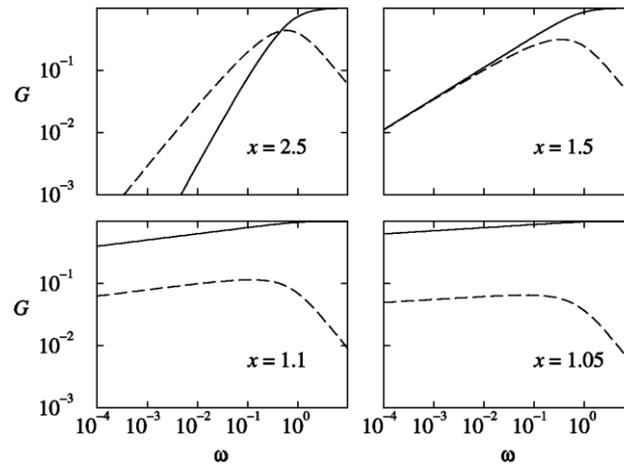


Figure 3-19 : Modules linéaires G' (continu) et G'' (tireté) pour différentes température de bruit ; tirée de Sollich *et al.*, 1997.

On peut constater que nos résultats concernant les échantillons AA500 et C23 sont similaires à ceux obtenus par le modèle lorsque x est proche de l'unité et sur la première partie de la courbe (*cf.* Figure 3-19, pour $\omega < 0.1 \text{ rad.s}^{-1}$).

Or, lorsque x est compris en $1 < x < 2$, le modèle prédit une loi puissance en $(x-1)$ pour chacun des modules $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ et un rapport $\frac{G''(\omega)}{G'(\omega)}$ constant. Si l'on considère nos résultats, en particulier pour les échantillons AA500 et la condition C23, pour lesquels nous avons trouvé que $\alpha \approx \beta$ proche de 0,2 et 0,3 respectivement, on peut admettre que le paramètre $x-1=0,2$ et $x-1=0,3$, ce qui conduit à $x(\text{AA500})=1,2$ et $x(\text{C23})=1,3$.

Les résultats obtenus pour la solution AA500 sont très proches de ceux obtenus par Gobeaux *et al.* (Gobeaux *et al.*, 2010). Ceci montre la robustesse des mesures et leur reproductibilité.

Nous avons émis l'hypothèse que la solution C23 est constituée d'un assemblage de domaines organisés en contreplaqué au milieu d'une matrice isotrope non-organisée. L'arrangement de ces domaines est désordonné au niveau mésoscopique mais la solution ne coule pas, sauf en appliquant une contrainte suffisante. Le fait que les modules augmentent après deux heures de repos est intéressant car cela ne concerne que cette solution. On peut imaginer que les molécules des domaines en contreplaqué s'alignent au moment de la mise en place de l'échantillon et, qu'en relaxant, ces domaines se remettent en position d'équilibre. Il y aurait donc d'abord une perte partielle de l'organisation des domaines en contreplaqué puis une reformation de ceux-ci.

Le cas de la solution C1 est plus complexe du fait des différentes pentes observées. On constate en effet que $G'(\omega)$ évolue très peu jusqu'à $\omega_1 = 1,5 \text{ rad.s}^{-1}$. L'analyse des coefficients de la loi puissance montrent que $G'(\omega < \omega_1)$ est pratiquement indépendant de la fréquence alors que $G'(\omega > \omega_1)$ présente le même comportement que celui de la solution C23. Une analyse similaire peut être faite pour la composante $G''(\omega)$ pour

laquelle le point de changement de pente se situe à $\omega_2 = 10 \text{ rad.s}^{-1}$: au-delà de ce point, $G''(\omega > \omega_2)$ présente le même comportement que celui de la solution AA 500.

Le cas particulier de la condition C1 peut néanmoins aussi être interprété grâce au modèle discuté plus haut. En effet, nous avons constaté que la première partie de la courbe conduit à un exposant α proche de zéro, ce qui correspond à $x \approx 1$, comme ce qui reporté dans le cas d'émulsions denses (Khan *et al.*, 1988). Sur la première partie de la courbe, la solution C1 dont la pente est quasi nulle se comporte presque comme un solide. Il semblerait que cette solution soit plus cohésive, homogène dans sa structure. Par contre, dans la deuxième partie de la courbe, son comportement se rapproche plus de celui de la condition 23. C'est-à-dire qu'elle répondrait comme un mélange associant des domaines plus cohésifs immergés dans une phase désorganisée. La pulsation critique se localiserait donc vers 10 rad.s^{-1} .

3.6 Conclusions

Ce chapitre a montré qu'il existe des conditions physico-chimiques permettant de former une phase cristal-liquide en contreplaqué avec des solutions de collagène concentrées. La lumière polarisée, appuyée par la microscopie SHG, a montré que la phase établie par la condition 23 est très proche du contreplaqué que l'on trouve dans le stroma cornéen. On a pu voir que les solutions concentrées dans les microcellules qui ont été fibrillées présentent une organisation similaire à celle de la phase cristal-liquide. Ceci a été vérifié grâce à la microscopie électronique à transmission ainsi que sur des coupes semi-fines et par cryo SEM-FEG où l'on retrouve le contreplaqué mis en évidence dans les microcellules avec les solutions de collagène.

Ces résultats indiquent qu'il est possible de créer une matrice de collagène à une concentration précise et organisée en contreplaqué. La phase cristal-liquide se met en place pendant la concentration puis la solution peut être moulée et l'organisation stabilisée par fibrillogenèse. Les résultats concernant l'élaboration des matrices, synthétisées à 90 mg/mL , et leur caractérisation sont présentés dans le chapitre suivant.

Points clés du chapitre 3 :

- **obtention d'une phase cristal-liquide organisée en contreplaqué**
- **la SHG est une technique opératoire pour analyser l'organisation 3D du collagène I et elle confirme l'organisation type cornée obtenue par la condition 23**
- **les résultats expérimentaux en SHG concordent bien avec les modèles théoriques développés pour une organisation en contreplaqué idéale**
- **conservation de l'organisation cristal-liquide après fibrillogenèse**
- **organisation en contreplaqué obtenue pour des pH supérieurs à 3**
- **propriétés rhéologiques différentes en fonction des conditions physico-chimiques et similaires à celles attendues pour un matériau vitreux-mou : on formule l'hypothèse de domaines en contreplaqué insérés dans une matrice non organisée**
- **la solution organisée en contreplaqué possède des modules G' et G'' supérieurs à ceux des conditions cholestériques, en particulier ceux obtenus en acide acétique 500 mM**

CHAPITRE 4
CARACTERISATION DES MATRICES

4 Caractérisation des matrices

Ce chapitre est consacré à la caractérisation des matrices qui ont conduit aux propriétés physiques et chimiques potentiellement compatibles avec une utilisation en tant que cornée artificielle. Ainsi, seules les matrices transparentes présentant des propriétés mécaniques adaptées sont décrites. Les techniques de caractérisation présentées au chapitre 2 ont été utilisées pour décrire avec précision la microstructure des matrices élaborées.

4.1 Transparence des matrices fibrillées.

4.1.1 Influence de la condition physico-chimique

Afin de déterminer les meilleurs paramètres pour la synthèse des matrices, plusieurs conditions physico-chimiques ont été testées. L'ensemble des conditions est présenté dans le chapitre 2. La Figure 4-1 montre la transparence maximale des matrices synthétisées pour chacune des conditions physico-chimiques à une concentration en collagène de 90 mg/mL.

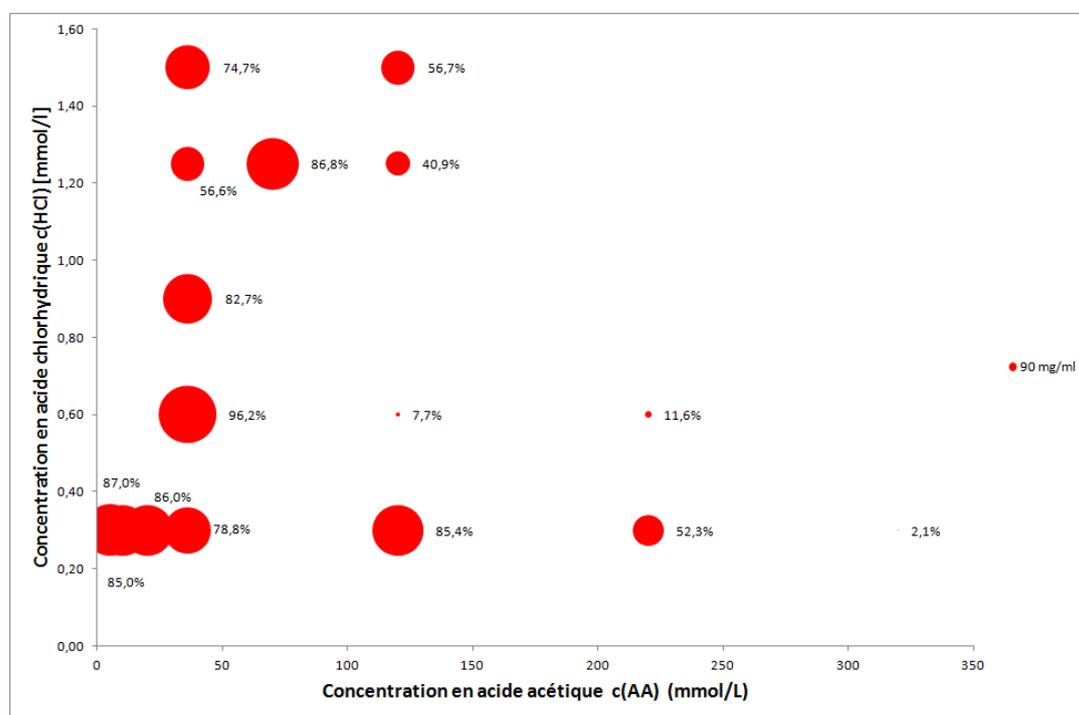


Figure 4-1 : Transparence maximale de l'ensemble des conditions physico-chimiques testées pour des matrices à 90 mg/mL. On voit la transparence en fonction des concentrations en acide acétique et en acide chlorhydrique. La taille des cercles est proportionnelle à la transparence.

Les résultats montrent que l'on obtient une très bonne transparence dans une région de faible concentration en acide acétique. La condition donnant la meilleure transparence à 90 mg/mL est la condition 5 pour laquelle on atteint 97 %. A la différence de ce que l'on a remarqué dans le chapitre 3 concernant l'organisation cristal-liquide en contreplaqué pour un pH supérieur à 3, il n'y a pas de corrélation notable entre le pH et la transparence. La condition 23 qui donne un contreplaqué en microcellule, permet d'obtenir des matrices présentant une transparence de 87 %. Les autres conditions physico-chimiques fournissant le contreplaqué ont des transparences similaires. Lorsque l'on utilise des concentrations élevées en acide acétique, des matrices peu transparentes voire totalement opaques, sont obtenues.

La Figure 4-2 présente les résultats obtenus par d'autres groupes de recherche.

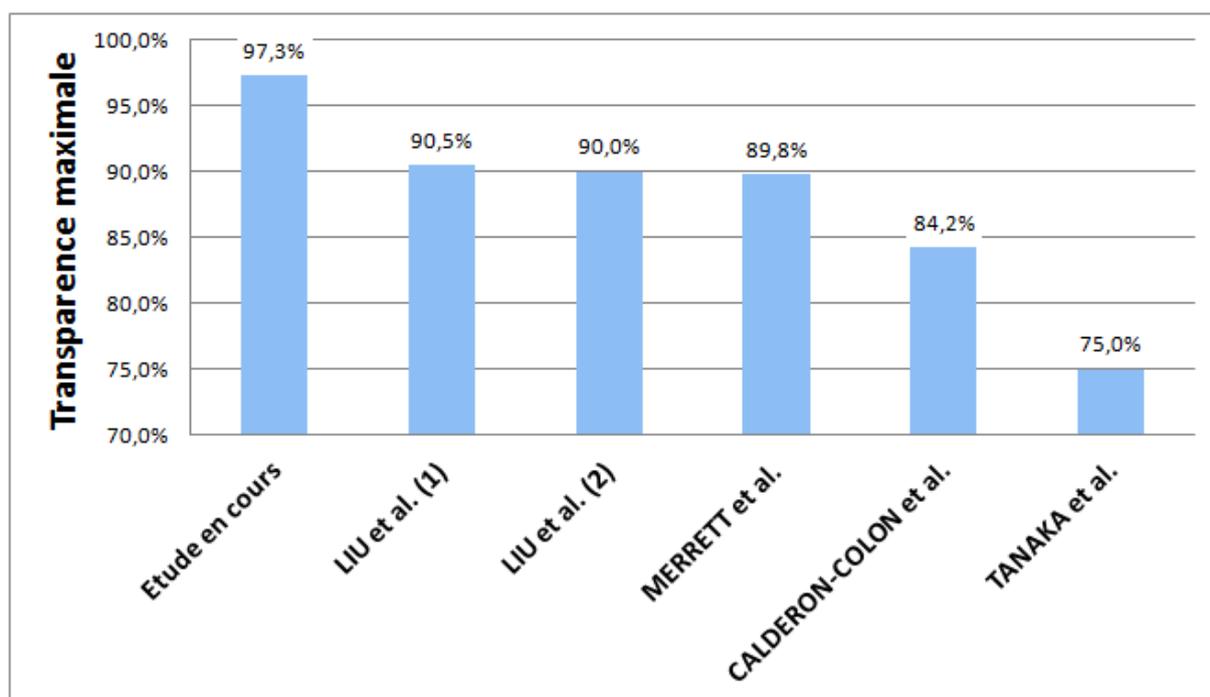


Figure 4-2 : Valeurs de transparence obtenues par d'autres groupes développant des cornées artificielles. On notera que la valeur maximale obtenue avec nos matrices est supérieure avec 97,3 % à 90 mg/mL.

4.1.2 Influence de la concentration des matrices

La figure 4-3 montre l'influence de la concentration des matrices sur la transparence. Les conditions 5, 6, 7, 23, 2, 20 et 22 ont été utilisées pour synthétiser des matrices à 60, 90 et 120 mg/mL. Les transparences ont toutes été mesurées 3 semaines après la fabrication pour des raisons qui sont détaillées dans le paragraphe 4.1.4.

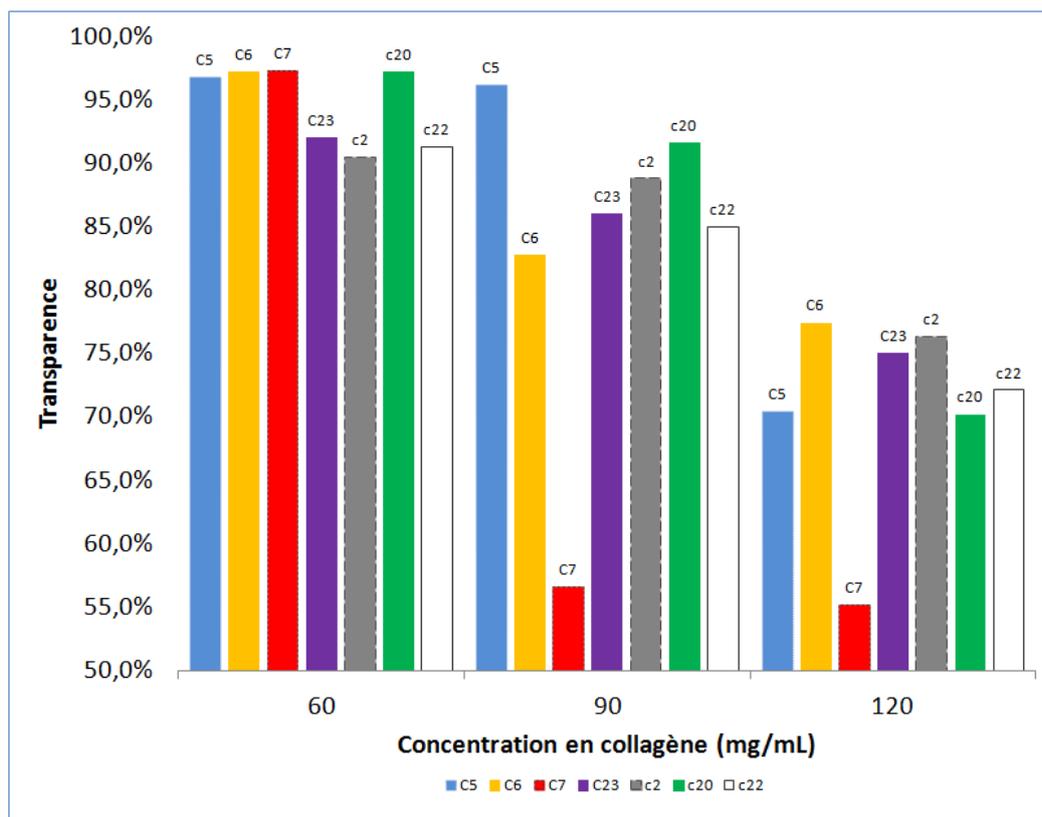


Figure 4-3 : Evolution de la transparence en fonction de la concentration pour différentes conditions physico-chimiques.

Pour chacune des conditions présentées ici, une transparence très élevée, aux alentours de 90%, est atteinte. Quelle que soit la condition, augmenter la concentration va de pair avec une diminution de la transparence. Cependant certaines conditions sont plus affectées par l'augmentation de concentration que d'autres. Par exemple la condition 7 passe de plus de 95 % à moins de 60 % à 90 mg/mL. La condition 20 à l'opposée est moins affectée, sa transparence restant supérieure à 90% à 90 mg/mL. Une des causes de la diminution de la transparence est l'augmentation de la densité de fibrilles. L'organisation des fibrilles doit également jouer un rôle. On verra dans le paragraphe 4.1.5 que la transparence a tendance à augmenter lors des deux premières semaines après la fabrication, sans doute du fait d'une redistribution des molécules dans les fibrilles afin d'équilibrer les diamètres de celles-ci. Ainsi, en fonction de l'organisation des fibrilles et de leur diamètre, cette redistribution peut se faire de façon efficace pour la transparence ou non.

4.1.3 Influence du temps de fibrillogénèse

Sans cellules, les solutions concentrées sont mises à fibriller sous vapeur d'ammoniaque dans un dessiccateur. Il a donc fallu vérifier l'influence du temps passé par les matrices

sous vapeurs d'ammoniaque sur leur transparence. Cette étude a été menée sur des matrices de condition 7 à 60 mg/mL. Les résultats sont consignés dans la Figure 4-4.

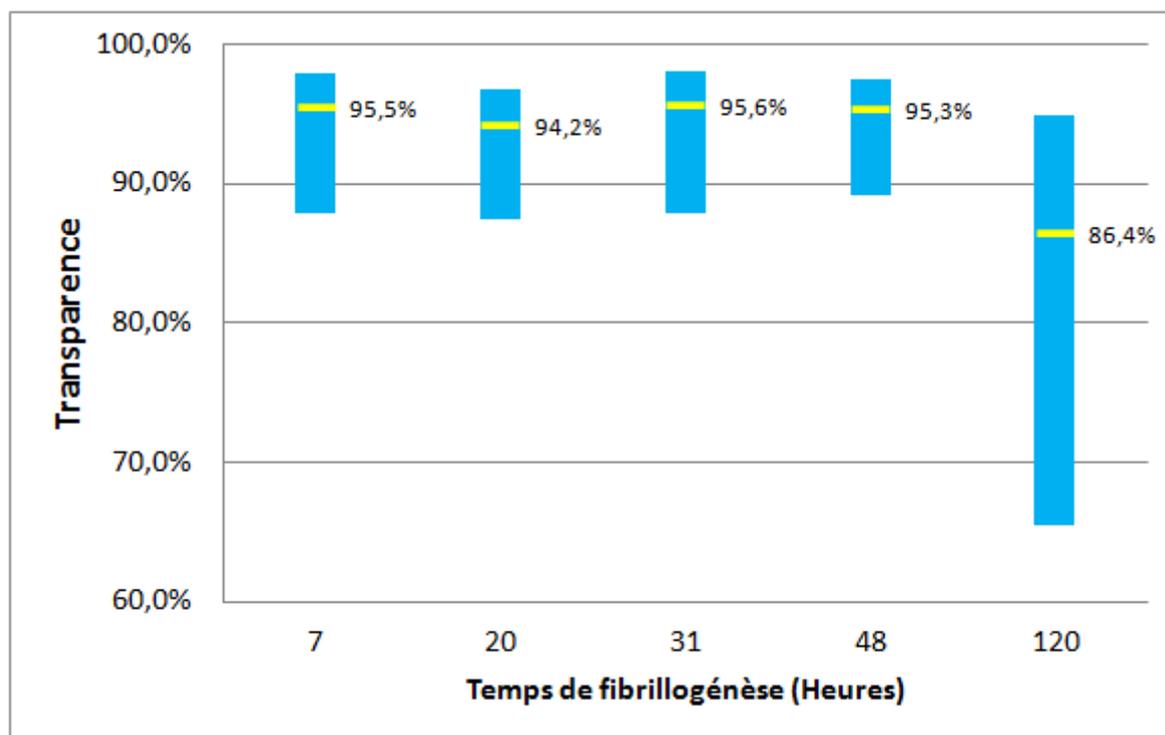


Figure 4-4 : Transparence de matrices synthétisées avec la condition 7 soumises à différents temps de fibrillogénèse. Les barres sombres représentent la transparence entre 380 et 780 nm et la valeur moyenne est donnée par la barre claire.

Entre 7 heures et 48 heures d'exposition, la transparence n'est quasiment pas affectée. Cependant lorsque le temps de fibrillogénèse arrive à 120 heures, la transparence baisse sensiblement en passant de 95 % à 86 %.

Ceci est vrai pour une grande partie des conditions physico-chimiques mais pas pour toutes. Par exemple, les matrices synthétisées avec la condition 23 dont la transparence est de 87 % à 90 mg/mL ne changent pas même après une semaine sous vapeurs d'ammoniaque.

4.1.4 Influence du temps de maturation

Le temps de maturation est le temps passé par la matrice dans l'eau ammoniaquée (généralement de l'eau milli-Q) après la fibrillogénèse. Durant ce temps l'ammoniaque diffuse de la matrice vers l'eau. Une évolution de la transparence a été constatée dans les jours suivants la sortie de la matrice des vapeurs d'ammoniaque.

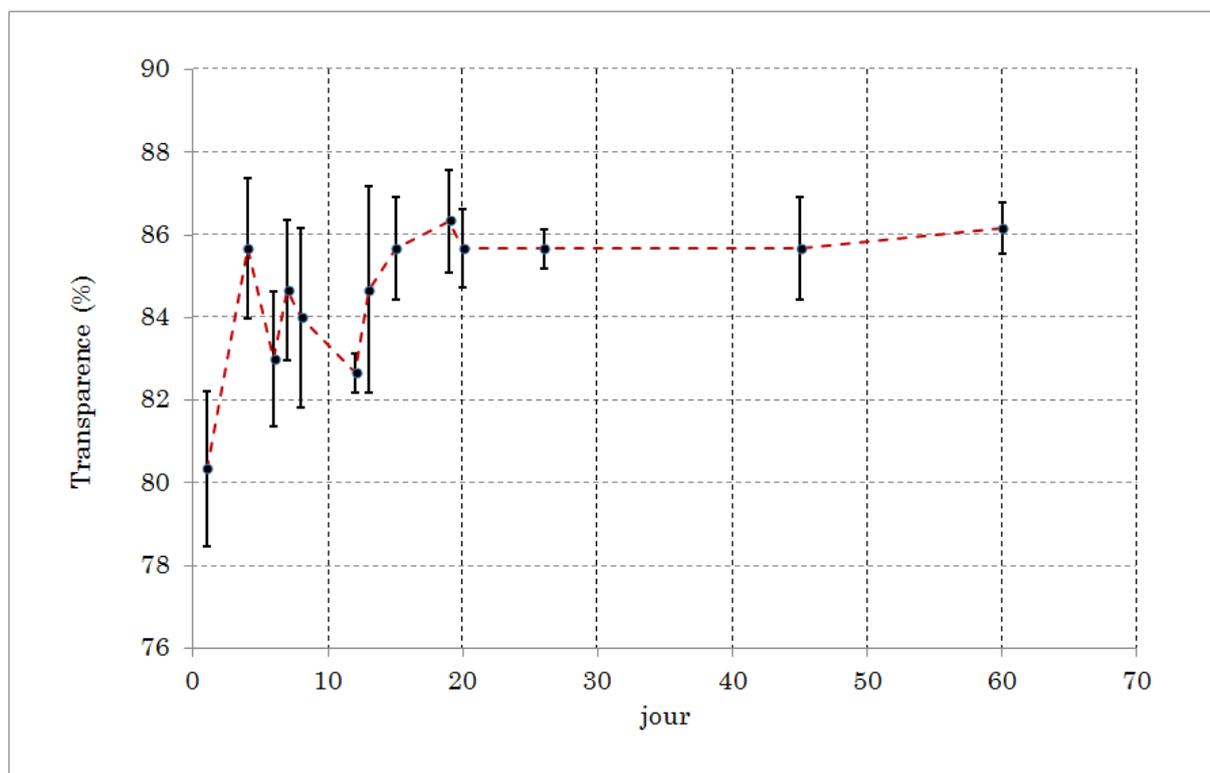


Figure 4-5 : Evolution de la transparence en fonction du temps pour des matrices synthétisées avec la condition 23. La transparence varie les deux premières semaines après la synthèse puis atteint un plateau et reste stable durant des mois.

La Figure 4-5 montre que la transparence varie les deux premières semaines. Il ne s'agit pas d'une simple augmentation régulière de la transparence. Nous observons une oscillation qui, malgré tout, reste dans le domaine d'incertitude. Après 15-20 jours la transparence a atteint un plateau et se stabilise. Ici, la condition 23 permet d'obtenir à 90 mg/mL une transparence de 86 % qui reste stable durant des mois. Il y a plusieurs hypothèses pour expliquer cette augmentation de transparence. L'une d'elles est une redistribution des molécules dans les fibrilles de sorte à homogénéiser le diamètre des fibrilles. Ainsi les molécules partiraient des fibrilles les plus grosses pour aller vers des fibrilles plus petites. On peut aussi imaginer que, lorsque les matrices sont sorties des vapeurs d'ammoniaque où il y a un phénomène de synérèse (séparation d'un liquide de son gel), pour être plongées dans l'eau, la réhydratation permette d'améliorer la transparence. La réorganisation des fibrilles elles-mêmes semble plus difficile.

La Figure 4-6 est une photographie d'une des matrices issue de la condition 23, 4 mois après sa fabrication. Elle apparaît clairement transparente.



Figure 4-6 : Photographie d'une matrice (condition 23) transparente plusieurs mois après sa synthèse.

Cependant, l'évolution de la transparence au cours du temps n'est pas identique pour toutes les conditions comme le montre la Figure 4-7. Certaines matrices voient leur transparence augmenter sensiblement plus que d'autres en fonction de la condition physico-chimique.

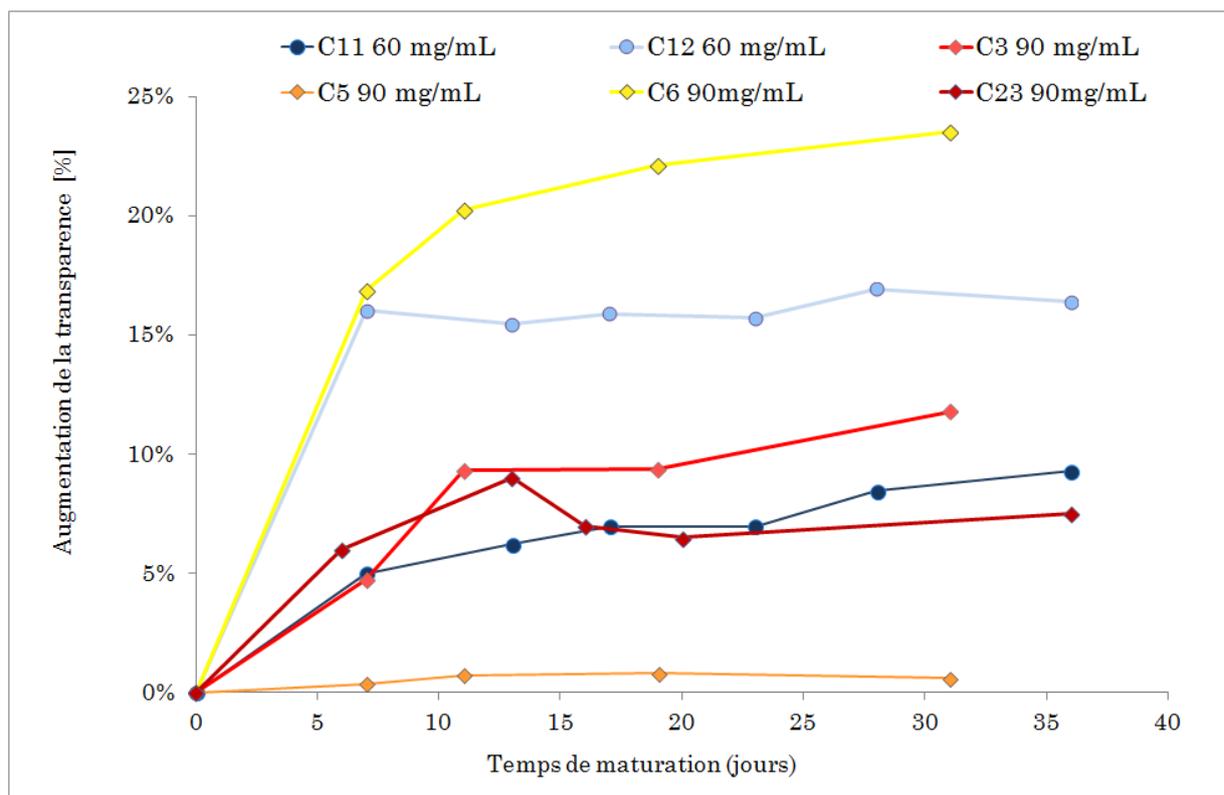


Figure 4-7 : Evolution de la transparence pour différentes matrices à 60 et 90 mg/mL. Cette augmentation est calculée en référence à la transparence de chaque matrice le jour de la synthèse.

La condition 5 ne voit sa transparence augmenter que de 1 % alors qu'à l'opposé, les matrices obtenues avec la condition 6, ont une transparence augmentée de 24 %, 30 jours après la synthèse.

4.1.5 Exemple de courbe de transparence pour la matrice synthétisée avec la condition 23 (contreplaqué)

La Figure 4-8 présente trois mesures de transparence typiques, obtenues pour des matrices synthétisées avec la condition 23, après 20 jours. Les trois courbes sont très proches. La transparence moyenne pour les trois matrices est de 86 %, ce qui est supérieur à celle obtenue pour une cornée humaine (présentée Figure 4-9). La transparence après 20 jours est supérieure à la transparence obtenue le jour de la mise en forme.

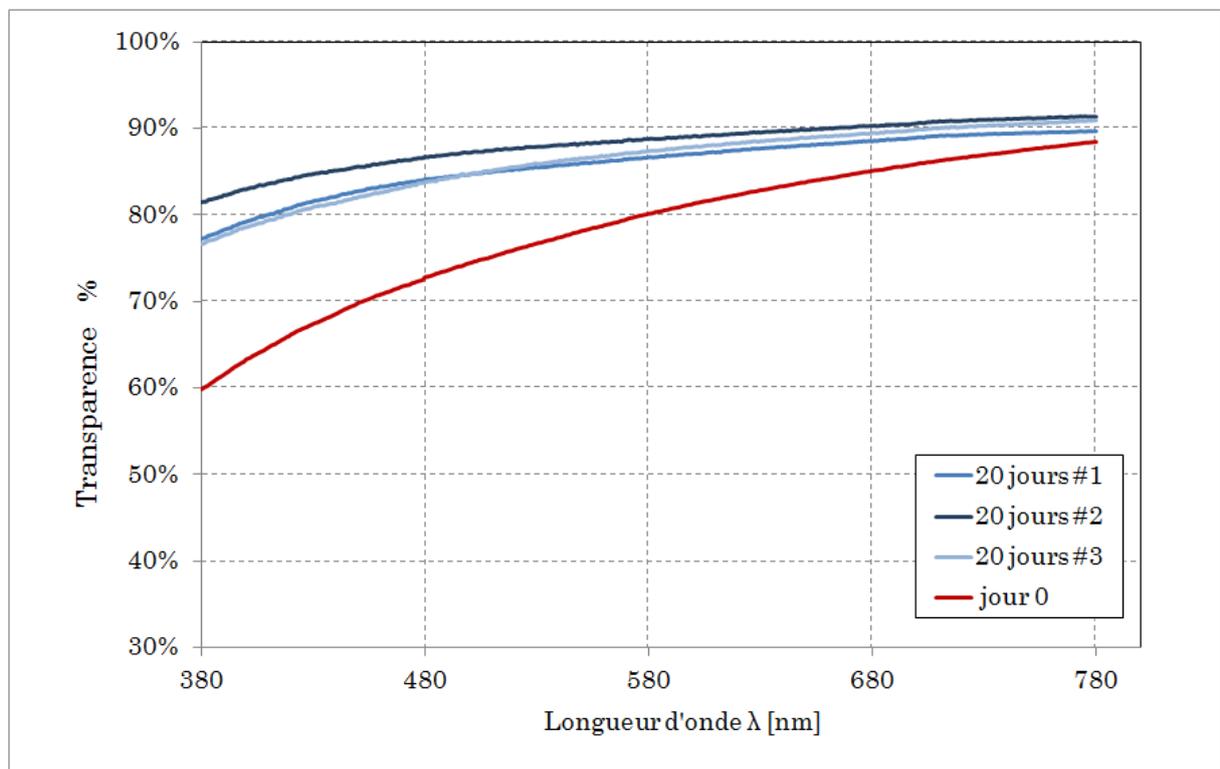


Figure 4-8 : Courbes de transparence en fonction de la longueur d'onde pour trois matrices de condition 23, 20 jours après leur fabrication.

4.1.6 Influence des cellules sur la transparence

Des matrices obtenues avec la condition 1 ont été synthétisées à 60 et à 90 mg/mL. Après culture de cellules épithéliales (voir chapitre 5) leur transparence a été de nouveau mesurée avant fixation des cellules. A 60 mg/mL comme à 90 mg/mL l'évolution de la transparence en fonction de la longueur d'onde n'est pas particulièrement modifiée. A 60

mg/mL, la transparence est même meilleure aux faibles longueurs d'ondes jusqu'à environ 480 nm. On ne retrouve pas ce phénomène à 90 mg/mL mais les deux courbes restent proches et, pour la matrice avec cellules, la transparence reste très bonne avec une valeur moyenne de 87 %.

Sur la Figure 4-9 on présente aussi la courbe de transparence pour une véritable cornée humaine dont la valeur moyenne atteint 80 %. Dans tous les cas, avec ou sans cellules, les valeurs moyennes obtenues pour nos matrices sont supérieures à celle de la cornée humaine.

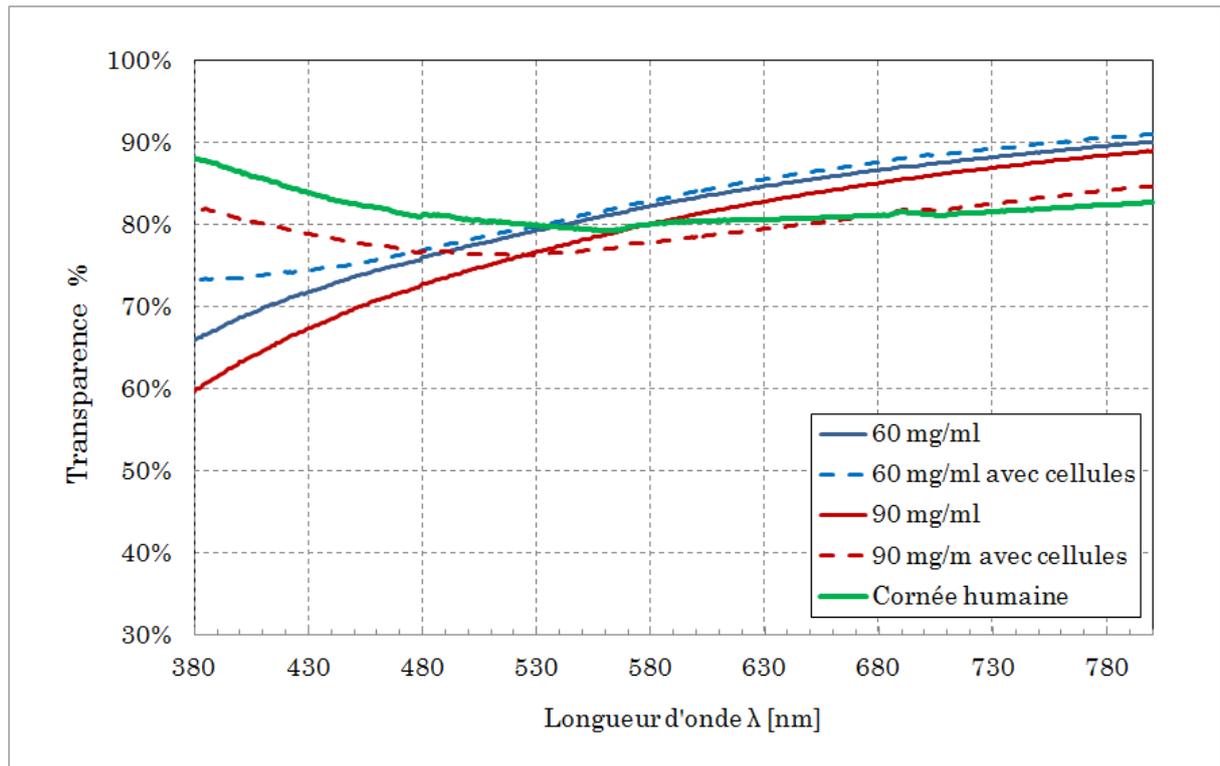


Figure 4-9 : Mesures de transparence (entre 380 et 780 nm) pour des matrices synthétisées avec la condition 1 à 60 et 90 mg/mL, en présence et en l'absence de cellules.

4.2 Caractérisation par microscopie électronique à transmission

Différentes matrices ont été étudiées durant ce projet. Les premières matrices soumises aux essais de culture cellulaire furent les matrices synthétisées avec la condition 1. La phase cristal-liquide associée à cette condition est une phase cholestérique. Néanmoins les résultats obtenus en culture cellulaire avec ces matrices ont été concluants (voir chapitre 5) et le paragraphe 4.2.1 présente leur structure. L'influence de la concentration en collagène sur l'organisation a été montrée avec ces matrices sur la Figure 4-10. Les paragraphes suivants montreront les différentes organisations obtenues en fonction des

conditions de synthèse, en particulier celles associées à des matrices opaques ou bien à une organisation de type cornée, soit en contreplaqué.

4.2.1 Matrices synthétisées avec la condition 1

Les matrices synthétisées avec la condition 1 l'ont été à quatre concentrations différentes de sorte à en voir l'influence sur le comportement des cellules, sur l'organisation du collagène et les propriétés mécaniques. La figure 4-10 montre les images prises en microscopie électronique à transmission sur des matrices à 15, 30, 60 et 90 mg/mL.

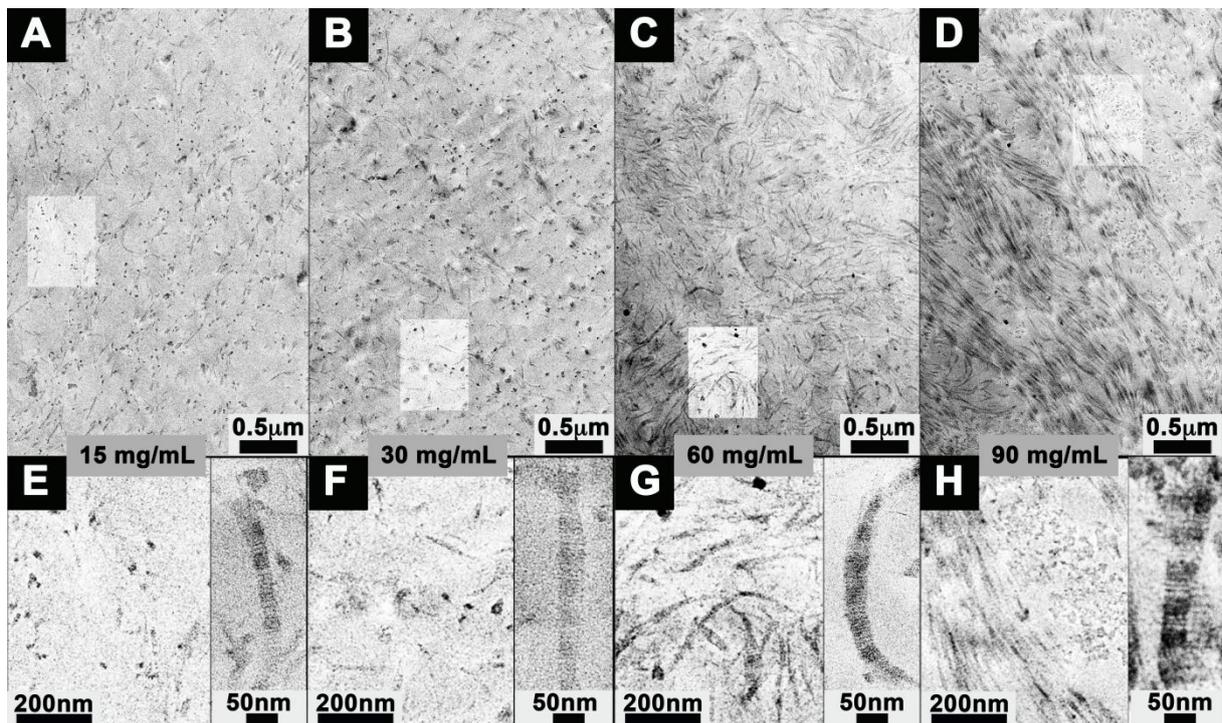


Figure 4-10 : Caractérisation des matrices par MET. On voit l'organisation des fibrilles de collagène à différentes concentrations : 15 mg/mL (A et E), 30 mg/mL (B et F), 60 mg/mL (C et G) et enfin 90 mg/mL (D et H). Les images E, F, G et H sont des zooms des zones éclaircies des images A, B, C et D respectivement. Dans tous les cas on distingue la striation caractéristique de 67 nm des fibrilles de collagène. Le diamètre des fibrilles apparaît compris entre 20 et 50 nm. La densité de fibrilles augmente avec la concentration. A 90 mg/mL, on voit apparaître une organisation des fibrilles avec une alternance de zones où elles sont transverses puis longitudinales. (Tidu *et al.*, 2015)

Les images E, F, G et H zooment sur les zones éclaircies des images A, B, C et D respectivement. Il apparaît clairement que plus la concentration augmente, plus la densité de fibrilles augmente. A 15 et 30 mg/mL la densité de fibrilles est faible. Elle augmente sensiblement à 60 mg/mL. Cependant l'organisation des fibrilles n'est observable qu'à 90 mg/mL. Ceci indique que la phase cristal-liquide cholestérique (liée à la condition 1), précédant la fibrillogenèse ne se met en place qu'à une concentration

supérieure à 60 mg/mL. A 60 mg/mL, les fibrilles n'ont pas d'arrangement particulier alors qu'à 90 mg/mL on voit une alternance de zones avec des fibrilles longitudinales (dans le plan de l'image) et des fibrilles transverses (perpendiculaires au plan de l'image) avec une rotation très rapide entre les deux orientations. Le diamètre des fibrilles reste assez faible, compris entre 20 et 50 nm ce qui explique la transparence des matrices. A 60 mg/mL, la densité de fibrilles est importante et, malgré la désorganisation de celles-ci, la matrice affiche une transparence à cette concentration proche de 90% grâce à ce faible diamètre. Quelle que soit la concentration, les fibrilles affichent une striation de 67 nm ce qui témoigne du bon processus de fibrillogenèse. A 90 mg/mL, l'épaisseur d'une zone où les fibrilles vont dans la même direction (soit longitudinale, soit transverse) est d'environ 0,5 μm . Ceci est inférieur à l'épaisseur moyenne d'une lamelle dans la cornée où les fibrilles vont également dans la même direction et qui est de 2 μm .

4.2.2 Observation de matrices opaques

L'observation au MET de matrices opaques a montré que l'organisation ainsi que la taille des fibrilles étaient importantes pour la transparence. On voit avec la Figure 4-11 un exemple de structure observée pour une matrice opaque obtenue avec la condition 10 à 90 mg/mL. Les fibrilles, bien que de diamètre assez faible, s'organisent pour former des structures en forme d'étoile de 200 nm de diamètre.

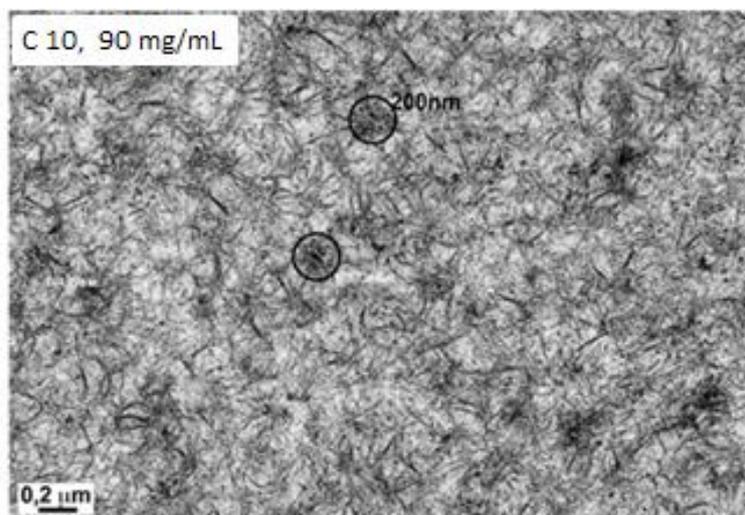


Figure 4-11 : Observation TEM d'une matrice opaque à 90 mg/mL. On remarque les amoncellements en forme d'étoile des fibrilles.

Les matrices translucides présentent parfois une légère augmentation de transparence lors de la maturation, mais qui reste très faible, et ces matrices ne deviennent en aucun cas transparentes. Il est sans doute compliqué pour des molécules engagées dans des

structures en étoile qu'on voit ci-dessous de s'extraire pour aller vers d'autres fibrilles. Il n'y a pas d'homogénéité des diamètres ni organisation particulière.

Toutes les matrices opaques n'ont pas forcément cette structure, certaines le sont en raison d'un diamètre important des fibrilles, couplé à une grande densité de fibrilles. Par exemple, les matrices synthétisées dans de l'acide acétique 500 mM présentent des fibrilles très grosses (100 à 300 nm de diamètre) et sont opaques même à de très faibles concentrations (la solution issue de la purification, qui est à 3mg/mL environ, devient opaque dès qu'on provoque la fibrillogenèse). Des images prises en SHG dans un autre contexte (culture de cellules endothéliales HUVECs) présenté dans le chapitre 5, montrent la différence de diamètre dans les fibrilles des matrices issues de la solution « stock » et celles de la condition 23 par exemple (en jaune dans la Figure 4-12).

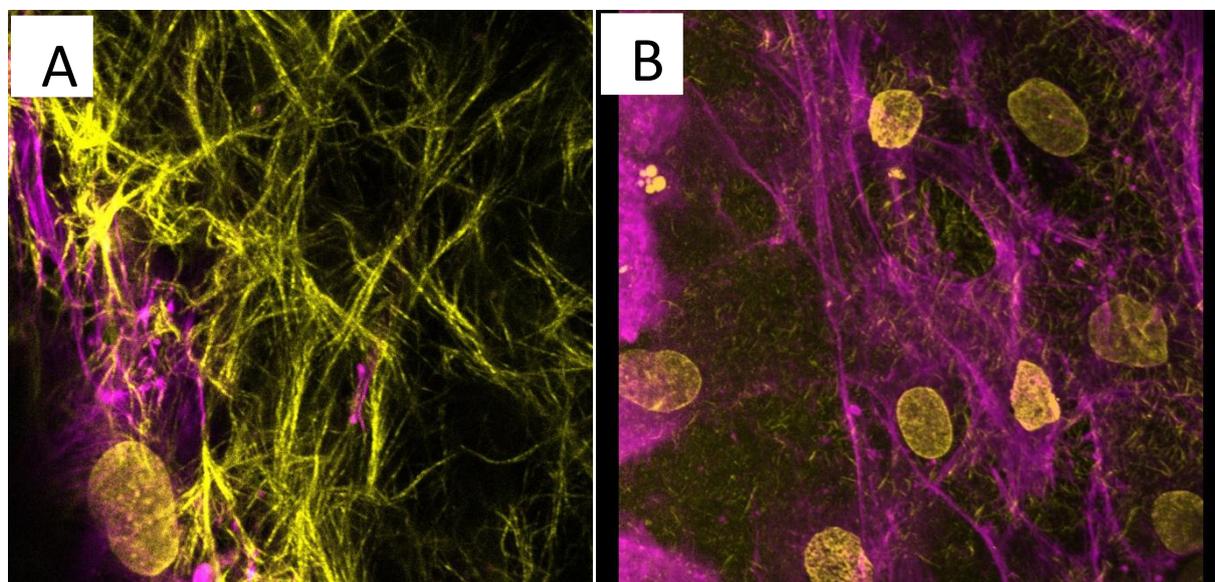


Figure 4-12 A : Solution de collagène dans l'acide acétique 500 mM fibrillée, à 90 mg/mL. B : solution fibrillée de condition 23, à 90 mg/mL. Les gels sont en présence de cellules endothéliales HUVECs. (En rose : fibres d'actines ; en orange : noyaux cellulaires) On voit, en jaune, les fibrilles beaucoup plus grosses dans l'acide acétique 500 mM.

4.2.3 Matrices synthétisées avec la condition 23 (organisation en contreplaqué)

Les matrices synthétisées avec la condition 23 donnent des phases en contreplaqué dans les microcellules. Les solutions pour réaliser ces matrices sont concentrées par centrifugation filtration. La condition physico-chimique n'est donc pas exactement la même qu'en microcellule (cas beaucoup plus complexe) mais c'est le moyen qui permet à la fois de s'en rapprocher le plus possible et de travailler à condition fixe (hormis la concentration en collagène). Comme on fibrille une solution dont la phase cristal-liquide

s'est mise en place pendant sa concentration, on s'attend à ce que la matrice ait conservé cette organisation cristal-liquide, au moins localement. Les matrices observées ont bien révélé des domaines organisés en contreplaqué, même si celui-ci n'est pas parfait. On remarque de nombreuses zones sur différentes coupes de la même matrice avec des alternances de fibrilles longitudinales et transverses (Figure 4-13).

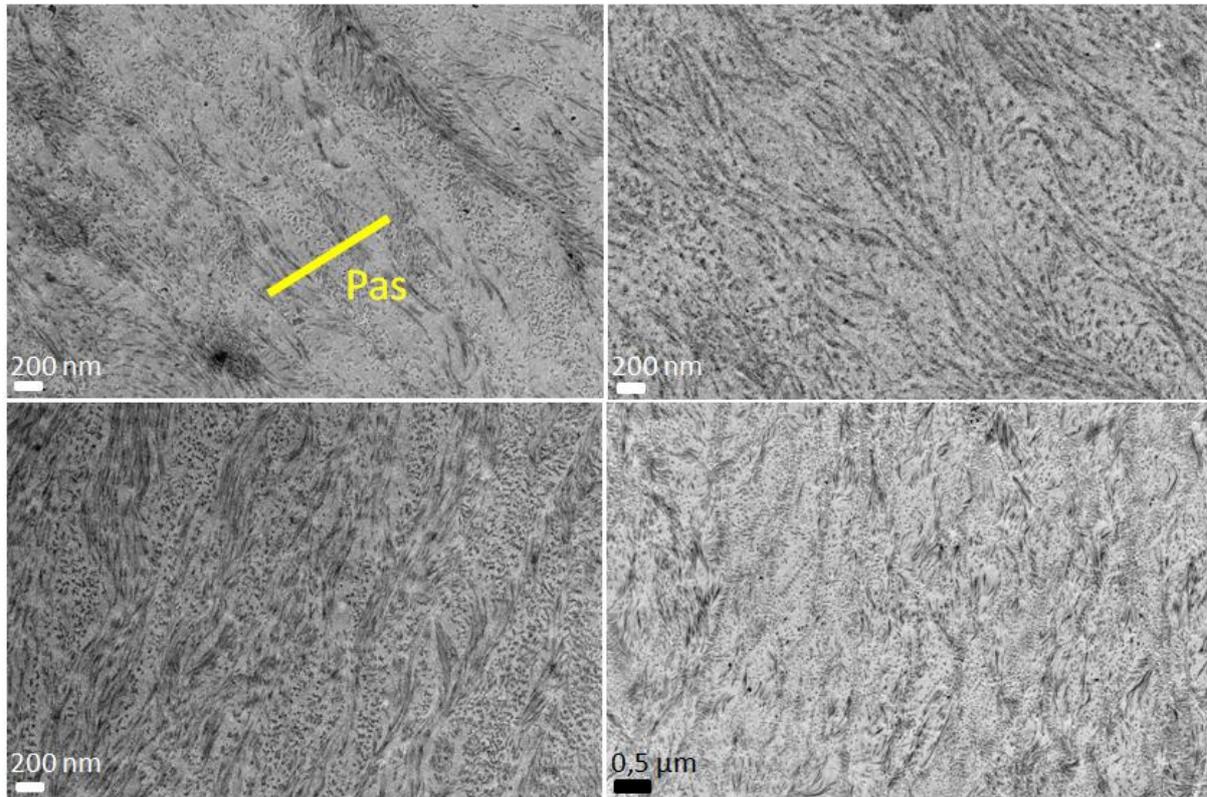


Figure 4-13 : Observation TEM de matrices synthétisées avec la condition 23. La structure en contreplaqué n'est pas aussi nette qu'en microcellule mais on distingue des alternances de zones avec des fibrilles transverses et longitudinales.

La microscopie électronique en transmission a montré qu'il y a bien des zones organisées en contreplaqué dans les matrices, mais il y a aussi des zones qui semblent localement cholestériques et d'autres sans organisation particulière. Le pas du contreplaqué est défini dans la Figure 4-14 (il est représenté sur la Figure 4-13).

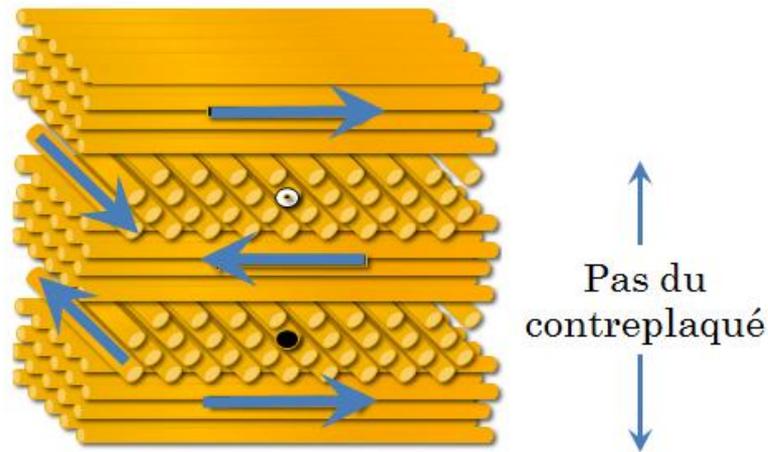


Figure 4-14 Définition du pas du contreplaqué

Les zones en contreplaqué donnent des pas de quelques centaines de nanomètres (entre 400 et 800 nm généralement) ce qui est plus faible que l'épaisseur des lamelles dans la cornée qui font 2 μm . C'est aussi plus faible que ce que l'on obtient en microcellule où les demi-pas font environ 2-4 μm .

4.2.4 Comparaison avec la membrane amniotique

Les membranes amniotiques sont utilisées actuellement pour aider à la cicatrisation des couches superficielles de la cornée comme l'épithélium. Elles permettent aux cellules de reformer l'épithélium dégradé. Ces membranes serviront de contrôle et de point de comparaison dans le chapitre suivant pour les expériences de culture cellulaire. Nous en avons donc préparé et observé au MET. Ces membranes ne sont pas composées de collagène de type I mais essentiellement de collagène de type IV (Figure 4-15).

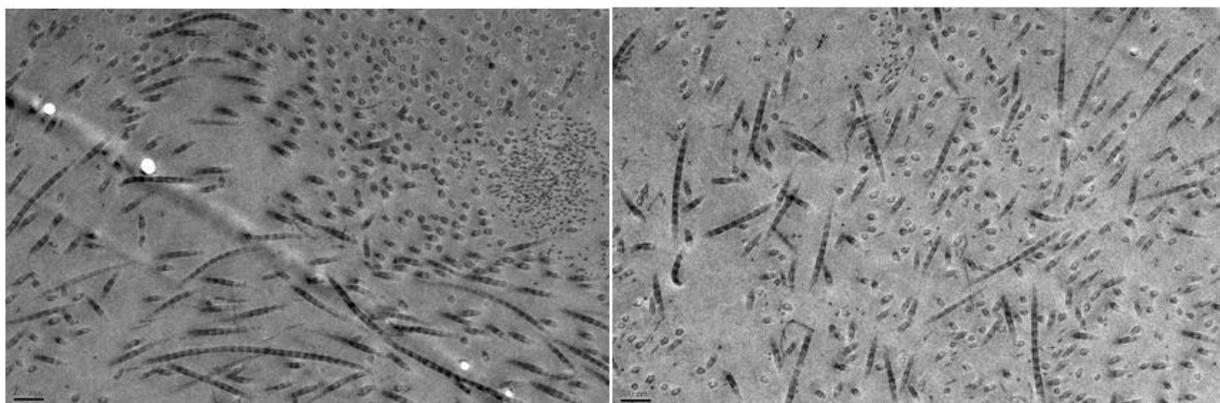


Figure 4-15 : Observation TEM de membranes amniotiques.

Les membranes amniotiques sont, entre autres, composées de collagènes fibrillaires mais on ne remarque pas d'organisation particulière. Les fibrilles présentent bien la striation à 67 nm et elles sont très longues. Leur diamètre est plus important que dans les matrices, aux environs de 50 nm, mais la densité de fibrilles est relativement faible par rapport aux matrices.

4.3 Propriétés mécaniques

4.3.1 Matrices synthétisées avec la condition 1

Les premières mesures mécaniques ont été effectuées sur les matrices synthétisées avec la condition 1 (3 matrices à chaque concentration). Les mesures ont été faites comme nous l'avons expliqué dans le chapitre 2. Des éprouvettes sont découpées dans les matrices que l'on recouvre de polylysine afin d'y fixer des billes de polystyrène. Les résultats obtenus pour les matrices synthétisées avec la condition 1 (organisation cholestérique) sont présentés dans la Figure 4-16. Le module d'Young augmente avec la concentration. A 30 mg/mL le module d'Young est de 77 ± 3 kPa et monte à 576 ± 32 kPa à 90 mg/mL. Il en va de même pour la contrainte à la rupture qui passe de 64 ± 4 kPa à 258 ± 19 kPa. C'est l'inverse pour l'élongation à la rupture qui est de $99 \pm 2\%$ à 30 mg/mL et de $54 \pm 3\%$ à 90 mg/mL. L'augmentation du module d'Young avec la concentration est logique compte tenu de l'augmentation de la densité de fibrille mais aussi de la mise en place d'une organisation dans la matrice. L'élongation à la rupture diminue avec la concentration. Les matrices à 15 mg/mL ont une élongation à la rupture plus faible que celles à 30 mg/mL et 60 mg/mL en raison d'une trop faible densité de fibrilles. Ces matrices sont difficilement manipulables et très fragiles. Beaucoup ont été cassées durant la mise en place de l'expérience ce qui explique aussi qu'elles ne figurent pas dans l'analyse statistique.

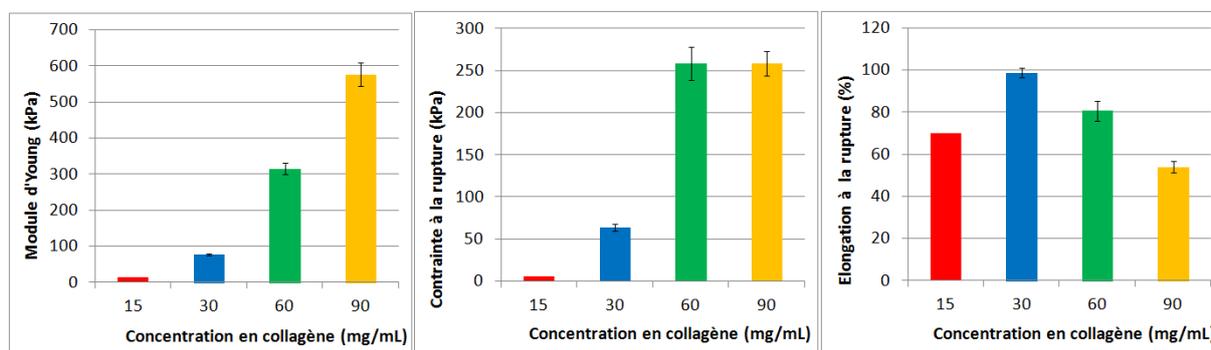


Figure 4-16 : Caractérisation mécanique des matrices synthétisées avec la condition 1. Le module d'Young et la force à la rupture augmentent avec la concentration en collagène. On passe de 77 ± 3 kPa à 30 mg/mL à 576 ± 32 kPa à 90 mg/mL pour le module d'Young. L'élongation à la rupture diminue de 30 mg/mL à 90 mg/mL en passant de $99 \pm 2\%$ à $54 \pm 3\%$. * (respectivement **) signifie $p < 0,05$ (respectivement $p < 0,01$).

Des matrices amniotiques ont été également testées et présentent des valeurs de module d'Young bien supérieures. En effet, sept membranes ont donné une valeur moyenne de 24 ± 3 MPa

Concernant la cornée humaine, la littérature mentionne des valeurs de module d'Young très variables, mais celles revenant le plus sont de l'ordre de 1 MPa ce qui est en dessous de la membrane amniotique mais au-dessus des valeurs de nos matrices.

4.3.2 Matrices synthétisées avec la condition 23

Les mêmes essais ont été conduits sur des matrices synthétisées avec la condition 23. Des matrices à 60 mg/mL et 90 mg/mL ont été utilisées.

La Figure 4-17 montre les courbes de traction pour cinq matrices issues de la condition 23 pour une concentration de 90 mg/mL. On constate que seuls trois des essais sont concluants. En effet, pour les essais notés ATB (vert) et ATC (rouge), les échantillons ont glissé dans les mors : les essais sont donc inexploitable.

On peut cependant remarquer que l'essai noté ATE, la courbe de traction présente des relaxations de la contrainte sans faire apparaître de variation de déformation dans la zone où apparait un plateau. Ce phénomène pourrait être lié à un endommagement de la structure du collagène par glissement ou rupture interne. L'espacement entre deux maxima locaux conduit à une estimation d'une longueur interne de l'ordre de 420 μm .

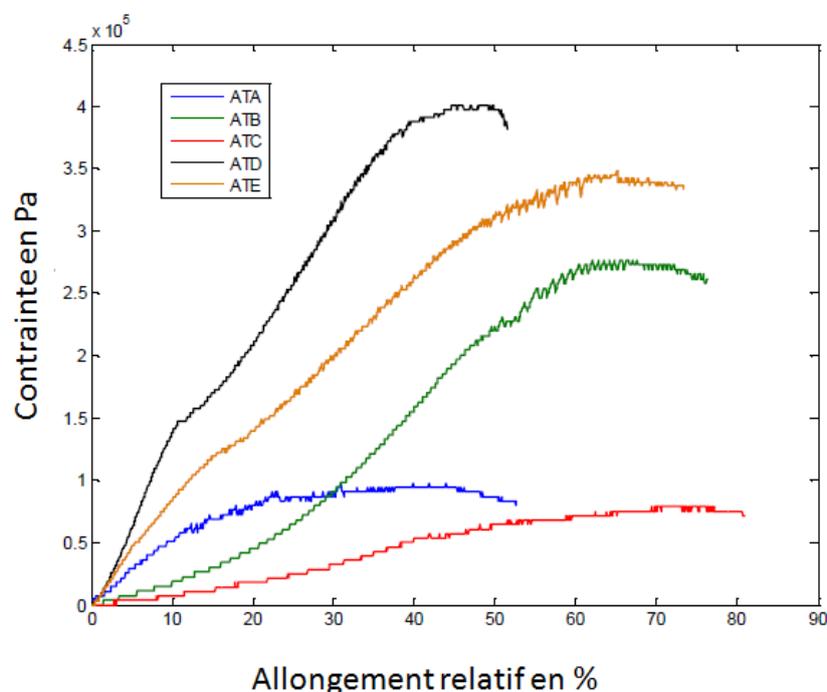


Figure 4-17 : Essai de traction sur les matrices issues de la condition 23 à la même concentration de 90 mg/mL.

La Figure 4-18 synthétise les résultats concernant le module d'Young. Les matrices à 60 mg/mL (en rouge) et 90 mg/mL (en vert) sont issues de la même purification de collagène alors que les matrices à 90 mg/mL en bleu proviennent d'autres purifications. Pour les matrices à 90 mg/mL en vert, une valeur moyenne (pour 3 matrices) de 872 ± 116 kPa est obtenue pour le module d'Young. Celles issues des autres purifications (4 matrices) donnent une valeur de 905 ± 230 kPa. Comme pour les matrices de la condition 1, l'augmentation de la concentration entraîne une augmentation du module d'Young, les matrices à 60 mg/mL donnant une valeur moyenne de 365 ± 79 kPa.

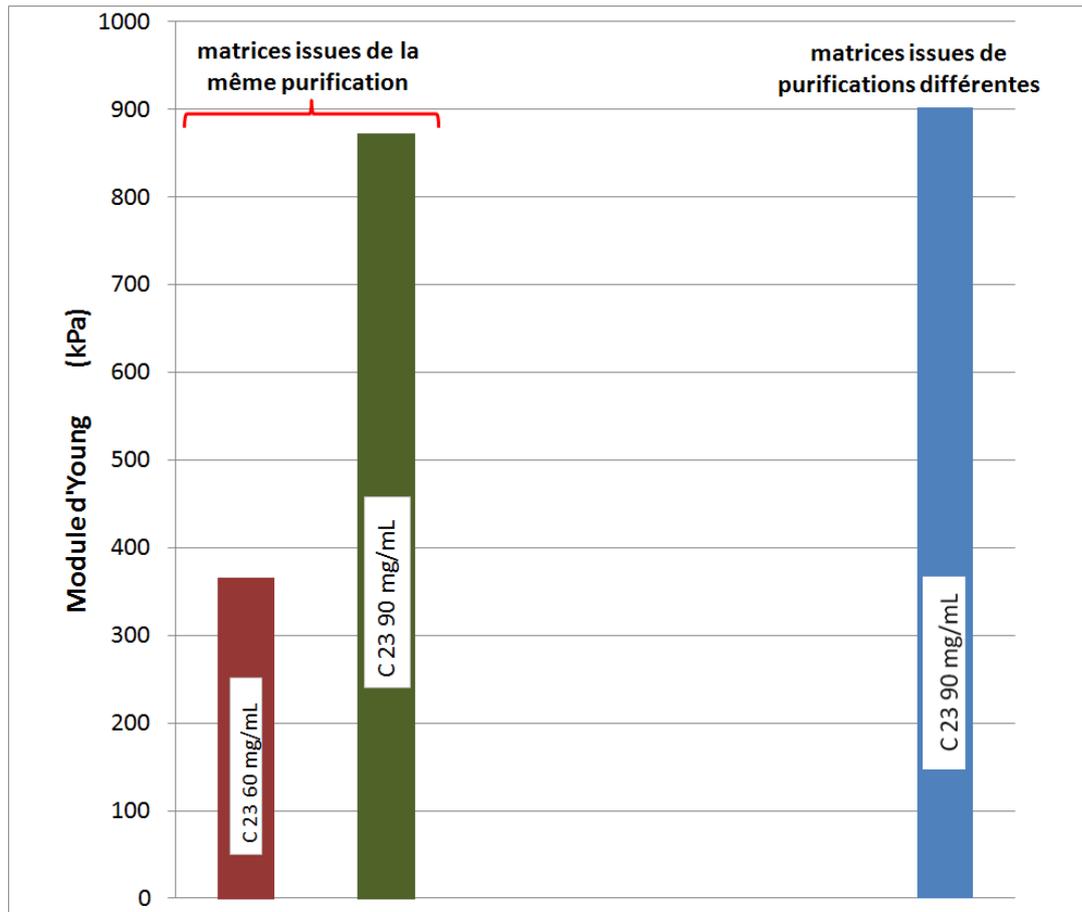


Figure 4-18 : Mesures mécaniques sur des matrices synthétisées avec la condition 23 à 60 mg/mL (en rouge) et à 90 mg/mL (en vert et en bleu) provenant de purifications différentes de collagène.

L'allongement à la rupture pour les matrices à 90 mg/mL atteint 48 % et la contrainte maximale est de $280 \text{ kPa} \pm 81 \text{ kPa}$ pour les matrices représentées par la barre bleue sur la Figure 4-19.

L'écart type pour le module d'Young est assez important (905 ± 230 kPa dans un cas et 872 ± 116 kPa dans l'autre). Cela peut s'expliquer par le fait qu'elles proviennent de différentes purifications où sont utilisées différentes queues de rats (pas forcément toutes issues des mêmes types de rats). On notera que les matrices issues de différentes purifications (représentées en bleu) donnent un écart type plus important.

Le module d'Young de ces matrices synthétisées avec la condition 23, qui donne un contreplaqué, apparaît être plus important que celui obtenu pour les matrices synthétisées avec la condition 1 qui donne une organisation cholestérique, et donc plus proche de la cornée humaine.

4.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu que plusieurs conditions physicochimiques permettent de créer des matrices transparentes à 90 mg/mL. Une zone se dégage : celle des faibles concentrations en acide acétique. Cependant, seules certaines conditions permettent d'avoir une organisation cristal-liquide des solutions de collagène en contreplaqué. Ces conditions ont été présentées dans le chapitre précédent. Ainsi une condition se dégage des autres car elle présente un très bon compromis : la condition 23 (10 mM en acide acétique et 0,3 mM en acide chlorhydrique). En effet, elle permet d'avoir une phase cristal-liquide en contreplaqué et des matrices transparentes avec des fibrilles dont le diamètre est de l'ordre de 10-15 nm, (inférieur à la cornée) ce qui est nécessaire pour la transparence. Le MET a permis de voir que les matrices synthétisées avec cette condition présentent des domaines organisés en contreplaqué ce qui montre que l'organisation cristal-liquide est en partie conservée. Ceci est en adéquation avec ce qui a été obtenu pour les solutions fibrillées issues des microcellules. Ainsi, il est possible de créer des matrices transparentes et organisées à partir de la phase cristal-liquide à condition de travailler à une concentration supérieure à la concentration de transition qui correspond au passage de la phase isotrope à la phase cristal-liquide organisée.

Différents paramètres, en plus de la condition physico-chimique (et donc du diamètre des fibrilles et de l'organisation), jouent sur la transparence comme le temps de fibrillogenèse ou le temps de maturation. Ainsi, les matrices voient leur transparence varier, mais globalement augmenter, durant les deux premières semaines avant d'atteindre un plateau et de rester stable durant des mois. Les matrices issues d'une phase cristal-liquide cholestérique comme celles obtenues avec la condition 1 sont quand même transparentes. Les matrices opaques présentent soit des fibrilles assez grosses, soit une organisation particulière comme on peut le voir sur la figure 4-11, qui ne permet pas aux molécules de collagène de se réorganiser au sein des fibrilles.

Les propriétés mécaniques des matrices augmentent avec la concentration en collagène (et donc également avec l'organisation, ce qu'on peut clairement voir avec la condition 1). Les matrices à 90 mg/mL présentent l'avantage d'être très transparentes (que ce soit la condition 1 ou la 23) et de posséder en même temps des bonnes propriétés mécaniques. Il apparaît que les matrices organisées en contreplaqué ont un module d'Young légèrement plus élevé (905 kPa environ contre 576 kPa).

Ainsi la condition 23 présente beaucoup d'avantages : une organisation en contreplaqué, une bonne transparence (supérieure à celle de la cornée) et des propriétés mécaniques proches de 1 MPa.

Points clés du chapitre 4 :

- **différentes conditions physico-chimiques permettent d'obtenir des matrices transparentes (en moyenne 90 % pour un maximum de 96 %)**
- **la condition 23 (10 mM AC + 0,3 mM HCl) donne, à 90 mg/mL : une bonne transparence proche de 90%, une bonne organisation locale en contreplaqué et des propriétés mécaniques supérieures à la condition 1**
- **les organisations cholestériques peuvent également donner des matrices transparentes tout comme celles présentant une structure en contreplaqué**
- **il existe un lien entre le pH et l'organisation contre-plaqué, mais il n'y a pas de lien entre le pH et la transparence**
- **la taille moyenne des fibrilles dans les matrices est d'environ 10 à 15 nm**
- **augmentation de la transparence les deux premières semaines après la synthèse des matrices**
- **les matrices issues de la condition 23 (10mM AC + 0,3mM HCl) possèdent des domaines organisés en contreplaqué (organisation cristal-liquide en partie conservée) : conservation partielle de l'organisation**
- **propriétés mécaniques des matrices en contreplaqué supérieures à celles des matrices avec une structure cholestérique**
- **la condition 23 donne les meilleures propriétés mécaniques :**

| Condition | Transmission maximale | Limite à la rupture (kPa) | Elongation (%) | Module d'Young (kPa) | Structure |
|-----------|-----------------------|---------------------------|----------------|----------------------|---------------|
| C 23 | 87% | 280 | 48% | 900 | contreplaqué |
| C1 | 88% | 258 | 45% | 576 | cholestérique |

CHAPITRE 5
ASPECTS BIOLOGIQUES

5 Aspects biologiques

5.1 Formation de l'épithélium

5.1.1 Rappel du dispositif expérimental

Un explant limbique est suturé à la surface de chaque matrice. Celles-ci ont été préalablement rincées pendant plusieurs jours avec de l'eau puis du PBS 1x et enfin du milieu de culture de sorte à éliminer toute trace d'ammoniaque. Il est important de suturer les explants avec la face épithéliale orientée vers le haut. Les résultats obtenus sur les matrices sont comparés à ceux obtenus sur des membranes amniotiques. Les premières expériences de ce type furent menées sur des matrices synthétisées avec la condition numéro 1 (Tidu *et al.*, 2015) et les résultats ont été encourageants. Cependant la phase cristal-liquide obtenue avec cette condition n'avait alors pas été vérifiée. Il s'agit d'une phase cristal-liquide cholestérique.

5.1.2 Culture des cellules épithéliales sur des matrices issues de la condition 1 et caractérisation

Les cultures ont été menées sur des matrices avec différentes concentrations : 15 mg/mL, 30 mg/mL, 60 mg/mL et enfin 90 mg/mL. On rappelle que le milieu de culture est changé tous les deux jours pour apporter les nutriments nécessaires au développement des cellules.

Après 14 jours de culture, une couche de cellules polygonales de taille moyenne 20 μm est observée sur toute la surface des matrices (par exemple Figure 5-1).

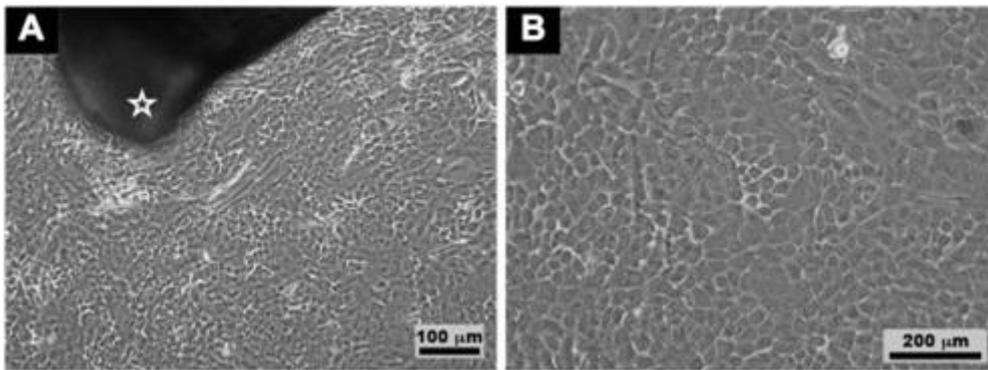


Figure 5-1 : Microscopie à contraste de phase montrant la croissance des cellules épithéliales à la surface des matrices (A et B) de collagène depuis l'explant (indiqué par l'étoile).

La forme classique des cellules épithéliales est donc retrouvée. Les coupes semi-fines ont révélé la présence d'une multicouche de cellules comme le montre la Figure 5-2:

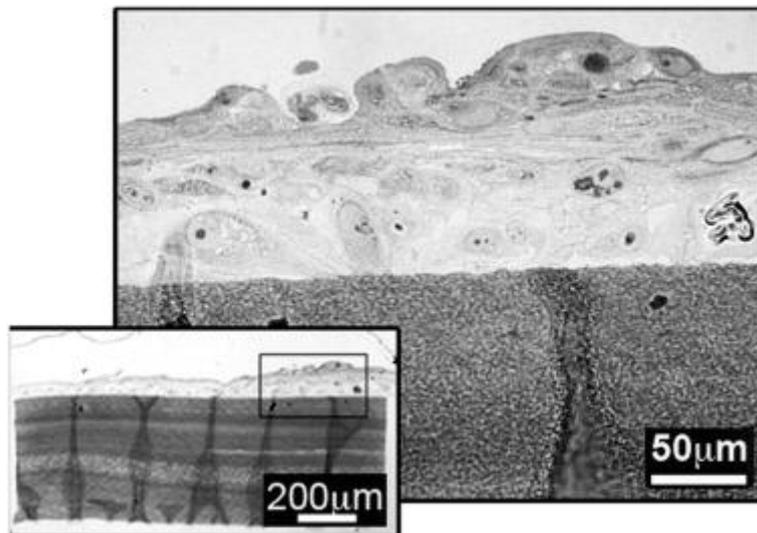


Figure 5-2 : Cette figure montre une coupe semi-fine réalisée à partir de matrices avec cellules fixées et incluses dans de la résine pour la microscopie électronique. Ici, la matrice est concentrée à 90 mg/mL. On peut observer un épithélium stratifié d'une épaisseur de 50 à 100 µm. (Tidu *et al.*, 2015)

L'épithélium formé a une épaisseur qui varie entre 50 et 100 µm et correspond donc à une multi-couche de cellules épithéliales.

La microscopie électronique à transmission montre également la présence de plusieurs couches de cellules comme le montre (C1 et C2) la Figure 5-3.

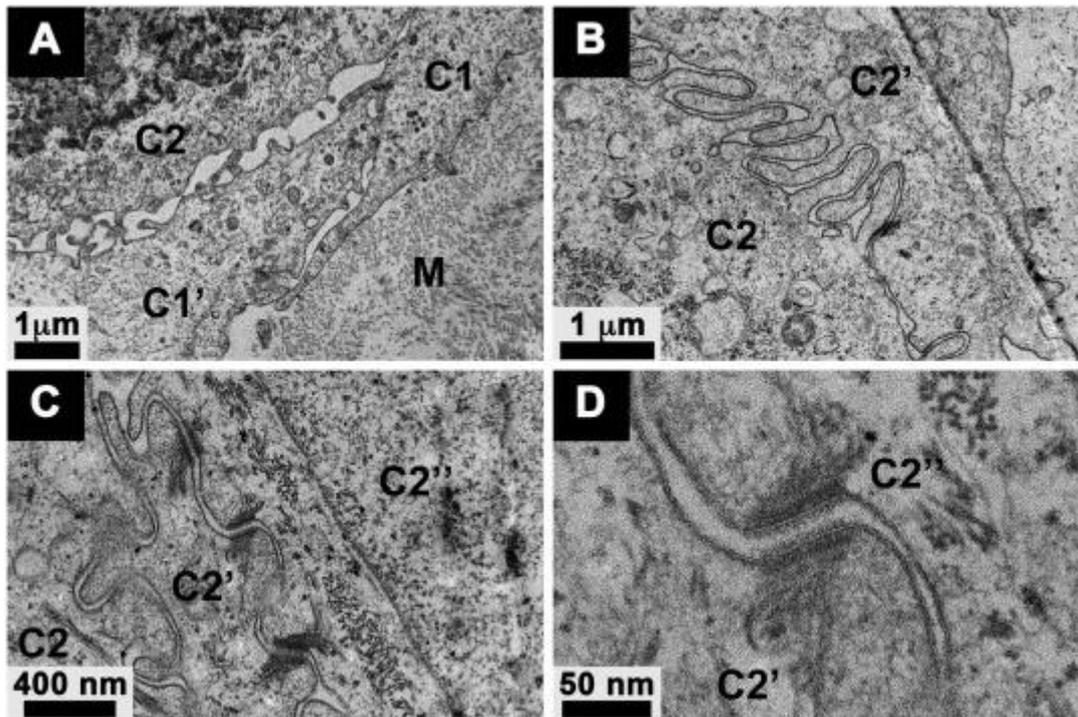


Figure 5-3 : Analyse TEM des matrices avec cellules. A : Deux couches de cellules (C1 et C2) sont présentes sur la matrice (M). B : Des interdigitations, caractéristiques des cellules épithéliales de cornées peuvent être vues entre deux cellules adjacentes (C2 et C2'). C et D : des séries de desmosomes sont observées le long de la jonction entre deux cellules. (Tidu *et al.*, 2015)

La figure 3B montre aussi les interdigitations caractéristiques entre deux cellules épithéliales ainsi que des desmosomes observés le long de la jonction (Figure 5-3C et D).

Il n'y a pas eu de différences observables en ce qui concerne la croissance cellulaire sur les matrices de différentes concentrations et la membrane amniotique.

Croissance des clones

Après la première culture, les cellules ont été dissociées et mises en culture sur des cellules nourricières 3T3 pendant 12 jours. Des colonies ont été obtenues avec la même efficacité par les cellules provenant des matrices, quelle que soit leur concentration en collagène, et que par celles des membranes amniotiques (Figure 5-4 A et B). Ceci est encourageant puisque les membranes amniotiques sont couramment utilisées pour faire croître des cellules avant transplantation.

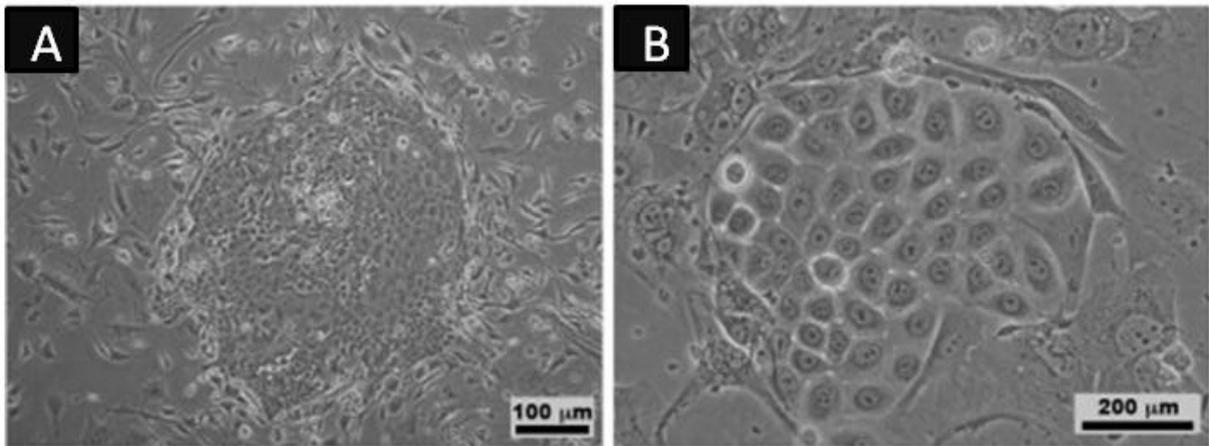


Figure 5-4 : Croissance clonale des cellules épithéliales dissociées, mises en culture en présence de feeders 3T3. La forme caractéristique des cellules épithéliales est retrouvée aussi bien sur la matrice de collagène (A) que sur la membrane amniotique (B).

Immunomarquages

Les immunomarquages ont révélé la présence de $\Delta Np63\alpha$, de cytokératine 3 (CK3) ainsi que de vimentine dans toutes les cultures, sur les matrices comme sur les membranes amniotiques. Les résultats sont présentés dans la figure Figure 5-5.

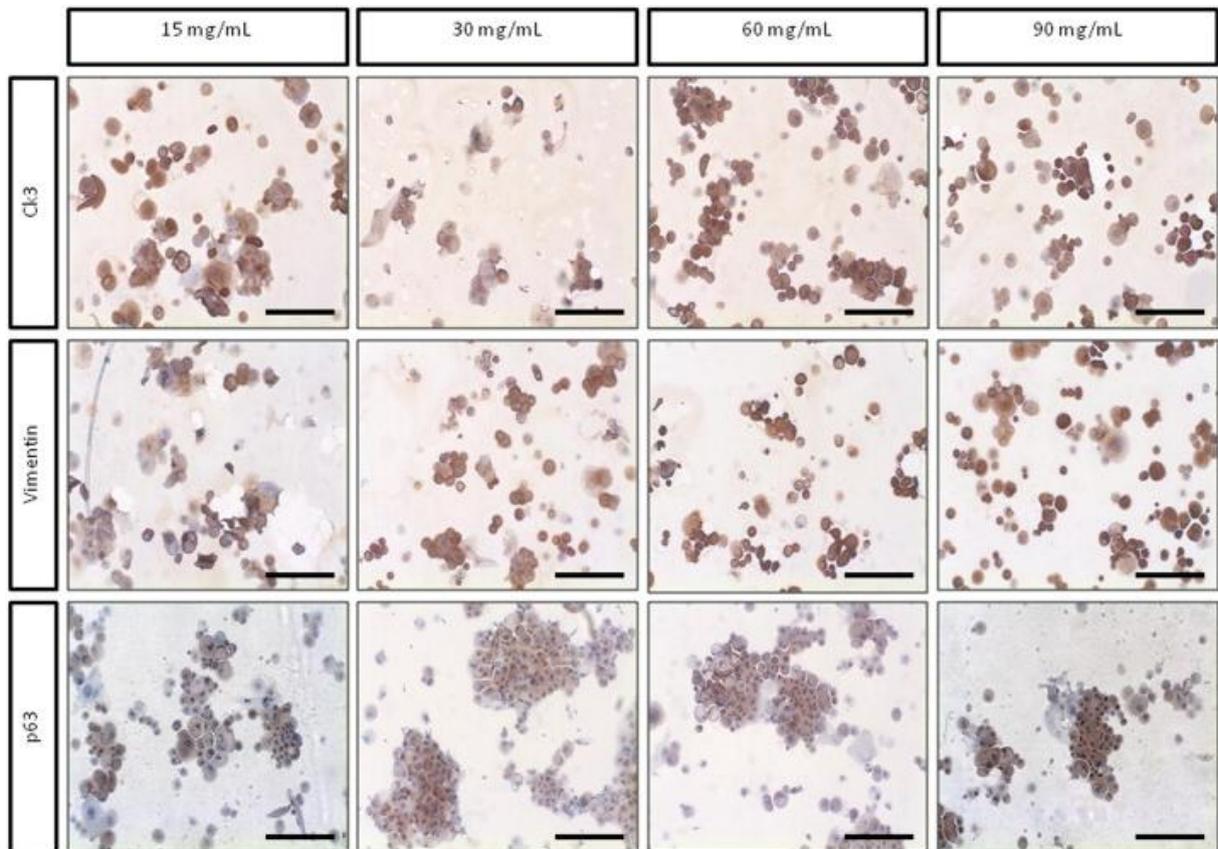


Figure 5-5 : immunomarquages des cellules épithéliales sur les matrices de collagène. Des marquages cytoplasmiques ont été réalisés avec des anticorps anti-cytokératine et anti-vimentine. Le noyau a été marqué avec un anticorps anti-p63 α . Barre d'échelle : 200 μ m. (Tidu *et al.*, 2015)

RT-PCR

La Figure 5-6 illustre les résultats de PCR quantitative en temps réel. Elle montre l'expression des transcrits pour CK-3, pour la vimentine et pour $\Delta Np63\alpha$. On peut voir que l'expression des transcrits pour CK-3 et $\Delta Np63\alpha$ est plus importante pour les matrices à 60 mg/mL que pour les autres supports. Le niveau d'expression du transcrit pour la vimentine, qui est un marqueur des kératocytes, est plus élevé avec les matrices à 15 mg/mL.

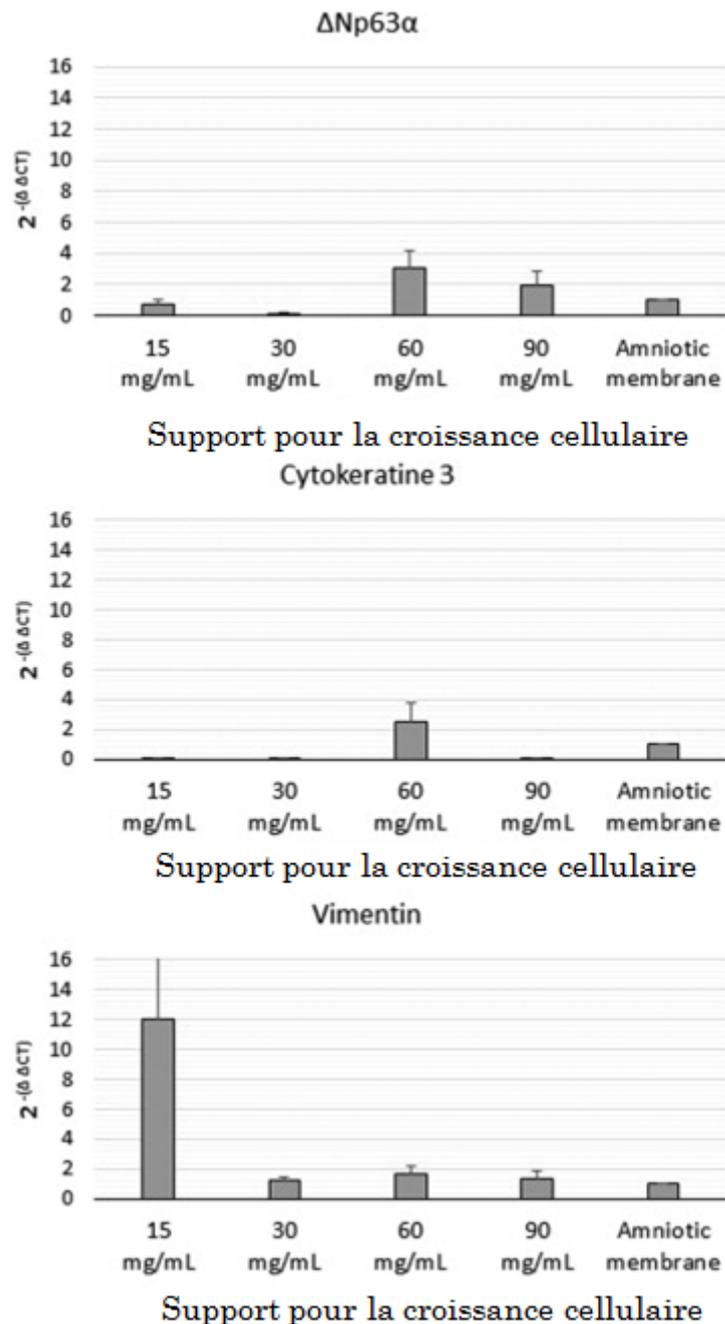


Figure 5-6 : PCR quantitative des cellules épithéliales limbiques cultivées sur les matrices de collagène et les membranes amniotiques (9 réplicats). La membrane amniotique est considérée comme le contrôle avec un niveau d'expression du transcrit (i.e. $2^{-\Delta\Delta CT}$) fixé à 1 pour les 3 ARNm recherchés. (Tidu *et al.*, 2015)

Ainsi les cellules à la surface des matrices de collagène ont bien le phénotype de cellules épithéliales cornéennes.

5.1.3 Formation de l'épithélium sur les matrices contreplaquée issues de la condition 23.

La même série d'expériences a été menée sur des matrices synthétisées avec la condition 23, c'est-à-dire celle fournissant une phase cristal-liquide en contre-plaqué. Les matrices ont une concentration de 90 mg/mL afin d'avoir des propriétés mécaniques acceptables et une meilleure organisation.

De la même manière, après 14 jours de culture on observe une multicouche de cellules à la surface des matrices comme le montre la Figure 5-7.

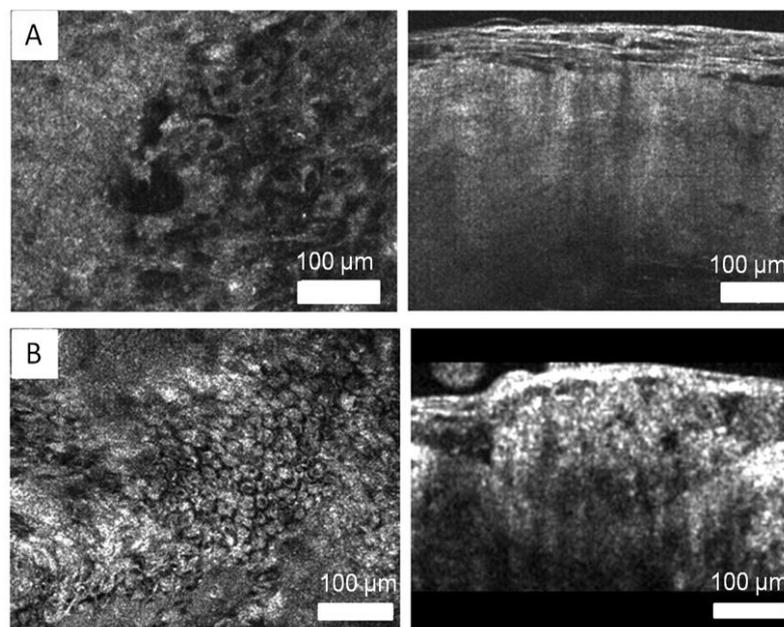


Figure 5-7 : Observation au FFOCM de la croissance des cellules à la surface des matrices (A) et sur une membrane amniotique (B). 4 à 5 couches cellulaires sont observées sur les deux supports.

Des invaginations sont observées sur les membranes amniotiques mais pas sur les matrices. Après la culture, les cellules sont dissociées et mises en culture avec des 3T3. La figure 8A montre que les cellules issues de la culture primaire sur les matrices forment des colonies sur les 3T3. Les cellules de ces colonies sont positives pour $\Delta Np63\alpha$ qui se trouve dans les noyaux. Dans les colonies, peu de cellules sont CK3 positives. Il est intéressant de voir que le pourcentage de CFE est similaire entre les matrices et les membranes amniotiques. Le pourcentage de CFE (1,2 %) pour les matrices synthétisées avec la condition 23 à 90 mg/mL est du même ordre de grandeur que celui obtenu pour

les matrices synthétisées avec la condition 1 à 60 mg/mL (% CFE = 0,7) qui est donc moins organisée et moins résistante mécaniquement.

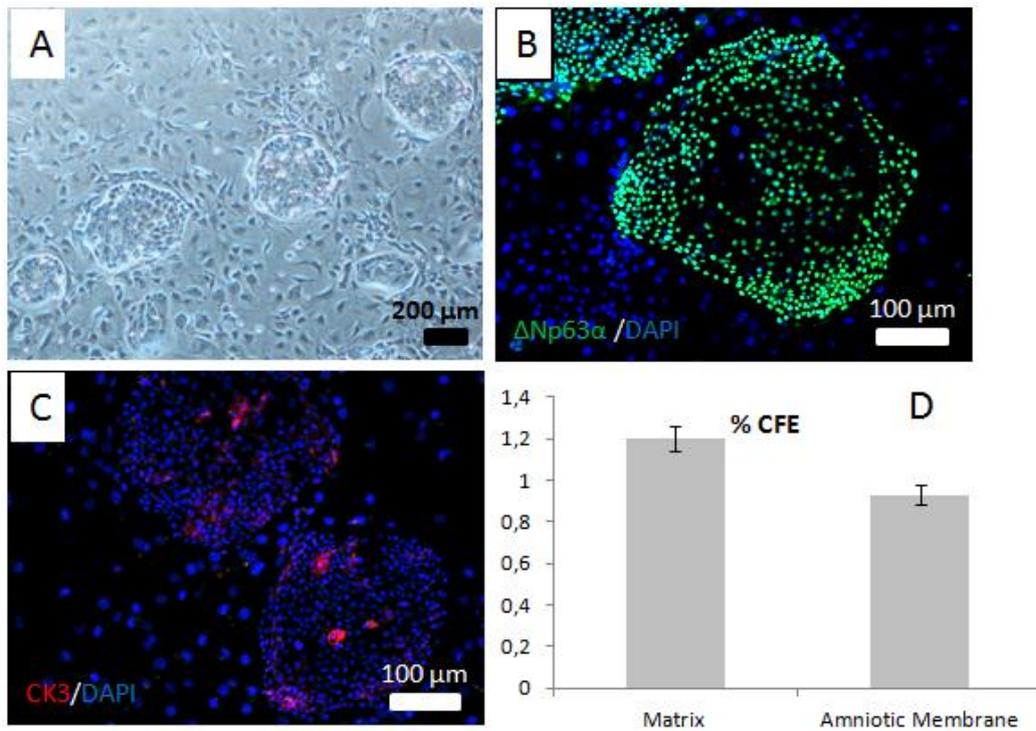


Figure 5-8 : Formation des colonies par les cellules dissociées des matrices et des MA. A. Image de cellules formant des colonies en culture. B. Les cellules des colonies montrent un marquage positif pour $\Delta Np63\alpha$. C. Peu de cellules sont CK3 positives dans les colonies. D. La différence dans le pourcentage de CFE n'est pas significative entre les matrices et les MA.

La Figure 5-9 présente les résultats de l'analyse phénotypique. On peut voir en rouge le marquage CK3 et en bleu le Dapi sur des échantillons de matrice (Figure 9A en haut) et de membrane amniotique (Figure 9A en bas) fixés et inclus dans de la paraffine. Quel que soit le support, les cellules expriment bien la cytokératine 3. Cependant la figure 9B montre que les expressions de CK3 et de p63 α des cellules qui colonisent la matrice sont plus élevées que celles qui colonisent la membrane amniotique.

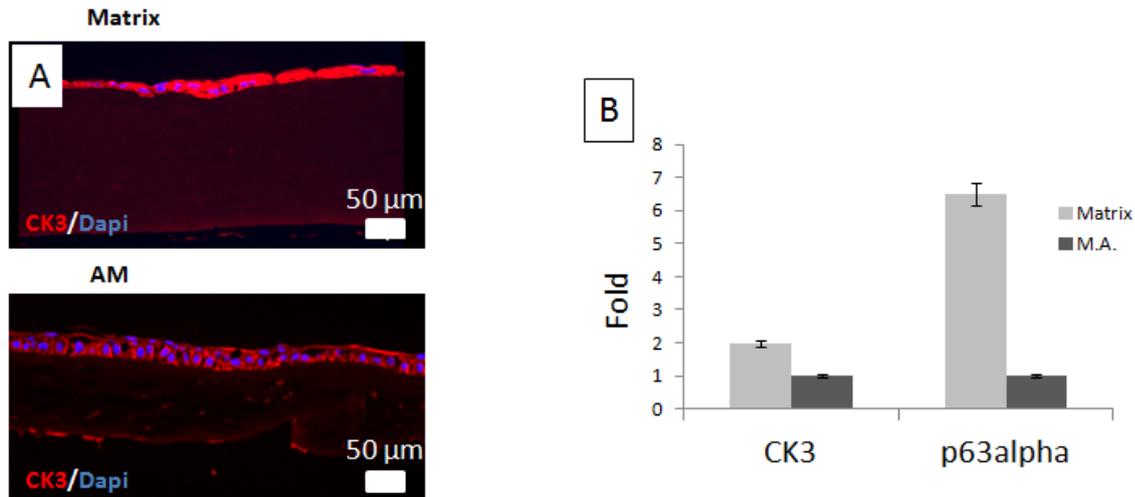


Figure 5-9: Analyse du phénotype des cellules. A. Immunomarquages réalisés sur des échantillons de matrices et de membranes amniotiques fixées dans la paraffine. Les cellules qui colonisent les deux supports présentent un marquage positif pour la CK3. B. L'ARN a été extrait des cellules présentes sur les matrices et les membranes amniotiques. Les expressions de CK3 et de p63 α sont significativement plus élevées avec les matrices qu'avec les membranes amniotiques.

En conclusion, les matrices denses de collagène supportent la croissance des cellules épithéliales puisque celles-ci expriment la cytokératine 3 et p63 α qui sont des marqueurs des cellules épithéliales cornéennes, et ce plus que lorsqu'elles sont mises en culture sur la membrane amniotique. En outre les cellules dissociées continuent d'exprimer à la fois la CK3 et p63 α dans les colonies avec un niveau comparable à ce qui est obtenu pour la membrane amniotique. En outre, les progéniteurs de l'épithélium cornéen sont conservés pendant la croissance de l'épithélium sur la matrice.

5.1.4 Observation MET des matrices avec cellules

Les matrices sur lesquelles a été effectuée de la culture de cellules épithéliales peuvent être préparées pour des observations au MET. La Figure 5-10 montre des images MET prises à la frontière entre la matrice et une cellule.

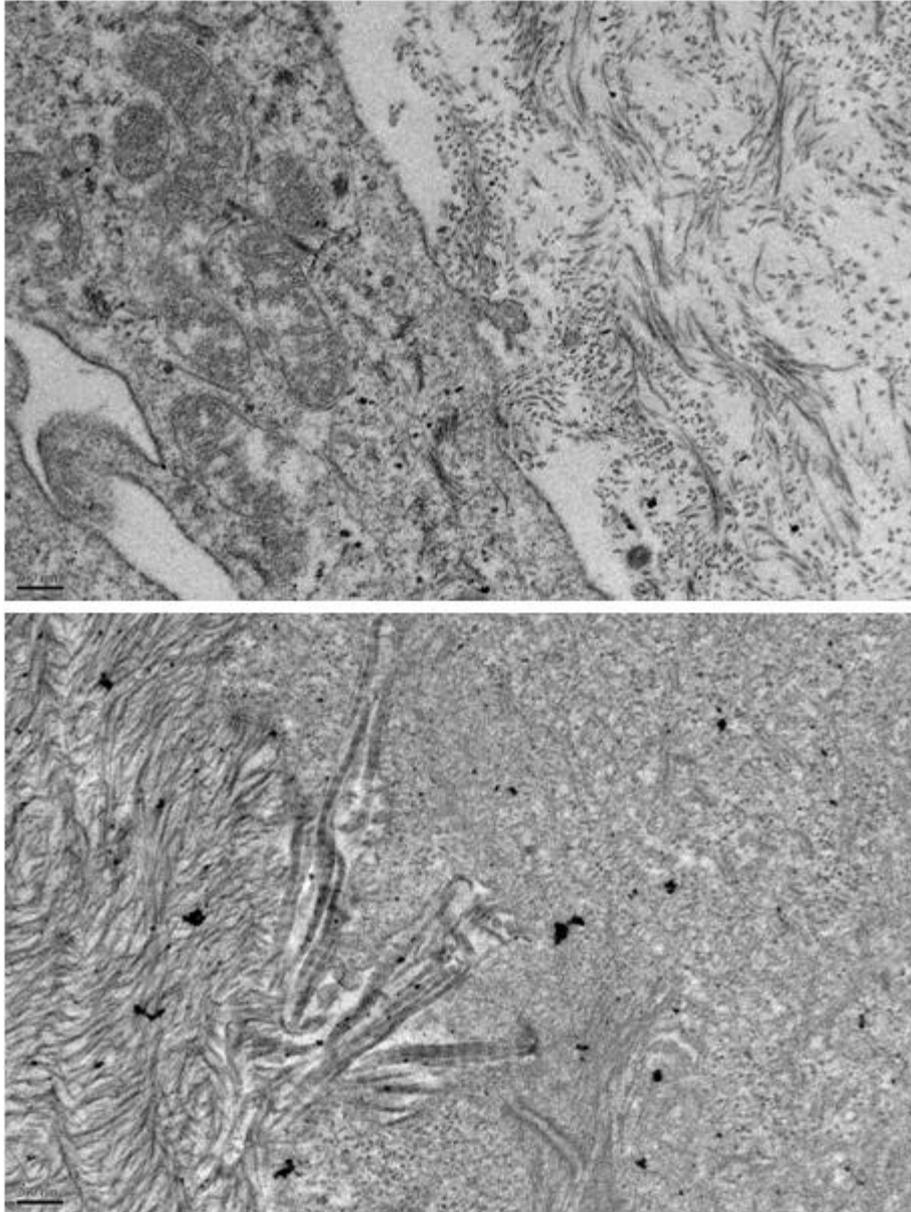


Figure 5-10 : Observation de matrices de condition 23 avec cellules épithéliales. Barre d'échelle : 200 nm.

5.2 Encapsulation des cellules stromales : Kératocytes

Afin de coller au plus près de la cornée, nous avons pensé à intégrer les cellules stromales, c'est-à-dire les kératocytes, directement dans le processus de fabrication des matrices. Ainsi nous pourrions cultiver les cellules épithéliales sur des matrices contenant des kératocytes à l'intérieur. Différents procédés ont été utilisés afin de déterminer celui offrant le plus de chances aux cellules de proliférer et de se différencier correctement dans la matrice.

5.2.1 Les différents procédés d'encapsulation

Afin d'inclure l'intégration des kératocytes dans le processus de fabrication, nous avons testé plusieurs procédés. Toutes les solutions de collagène utilisées pour ces expériences sont des solutions issues de la condition 23 (10 mM acide acétique-0,3 mM acide chlorhydrique)

Premier procédé

Les premiers essais ont été conduits dans des tubes de centrifugation-filtration. Il s'agissait de mélanger du collagène concentré aux alentours de 40 mg/mL avec du milieu de culture et un peu de soude (NaOH 0,1M) de sorte à neutraliser la solution. Il y avait un rapport 1 :1 entre la solution de collagène et le mélange milieu de culture/soude. La solution était volontairement choisie à 40 mg/mL pour que les cellules puissent pénétrer pendant la centrifugation. Les cellules étaient rajoutées au dessus de ce mélange et le tout était centrifugé à 1500 rpm et 4°C pour concentrer le mélange et faire rentrer les cellules à l'intérieur de la solution, ce qui les protégeait également d'un écrasement dû à la rotation du tube. La température était maintenue à 4°C afin de limiter la fibrillogenèse, le milieu étant basique. Ainsi les cellules devaient rentrer dans la solution pendant que celle-ci se concentrait légèrement. Ensuite la solution avec les cellules était retirée du tube de centrifugation et si possible (si la solution n'avait pas déjà commencé à fibriller) moulée en forme de pièce de monnaie. L'ensemble était alors placé dans des boîtes de culture 6 puits, à 37°C, et le milieu changé tous les 2 jours. Si la fibrillogenèse n'avait pas démarrée pendant la concentration à froid, elle le faisait dans ces conditions. Des prélèvements sur les gels étaient effectués au premier jour avec l'encapsulation, au septième et au quatorzième.

Second procédé

- Cette méthode a consisté à rajouter uniquement un culot cellulaire ou bien une suspension soit environ 100 μ L de milieu de culture avec cellules (30 000 cellules) au dessus de 100 μ l une solution de collagène à 40 mg/mL et de procéder à la centrifugation dans les mêmes conditions que pour le procédé précédent (Figure 5-11)
- Une méthode équivalente a été testée avec des petits tubes de centrifugation. Dans ce cas la solution de collagène était mélangée avec le culot cellulaire directement dans le tube, et le tout était centrifugé simplement le temps d'aplanir le mélange. Ensuite la partie amovible du tube était retirée et placée dans des plaques de culture avec de milieu et à 37°C ce qui provoque la fibrillogenèse de la solution avec les cellules.

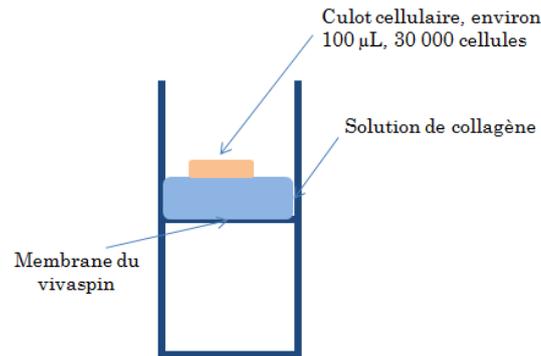


Figure 5-11 Représentation schématique du second procédé. Une suspension cellulaire est placée au dessus d'une solution de collagène à 40 mg/mL. En centrifugeant à 1500 rpm à 4°C, les cellules rentrent dans le gel et ne semblent pas passer la membrane du tube de concentration. Le collagène, lui, se concentre légèrement.

Troisième procédé

- C'est une variante du deuxième procédé à ceci près qu'au dessus du culot de cellules on rajoute un peu de solution de collagène de sorte à coincer les cellules au milieu et éviter qu'elles subissent trop de chocs sur la paroi du tube de centrifugation. La faible quantité de milieu de culture fait que l'ensemble reste acide et il n'y a donc pas de fibrillogenèse avant de mouler la solution et de placer du milieu de culture autour. Ceci permet donc de concentrer plus longtemps la solution qui n'est pas diluée au départ comme dans le premier procédé.
- De même que pour le procédé numéro 2 la méthode a aussi été testée avec les petits tubes de centrifugation ce qui permet d'avoir des matériaux assez plats.

Quatrième procédé

Ce procédé consiste à placer une solution de collagène plus concentrée, environ 60 mg/mL sur une lamelle de verre en disque. Le culot cellulaire en suspension (environ 100 µL) est placé au dessus et on rajoute éventuellement un peu de collagène par-dessus. Ensuite on vient aplatir le tout avec une autre lamelle ce qui permet de piéger les cellules dans la solution et d'avoir une forme de disque (Figure 5-12). L'étape suivante consiste à placer le montage dans une plaque de culture et de le couvrir de milieu. L'ensemble, placé dans l'étuve à 37°C commence alors à fibriller.

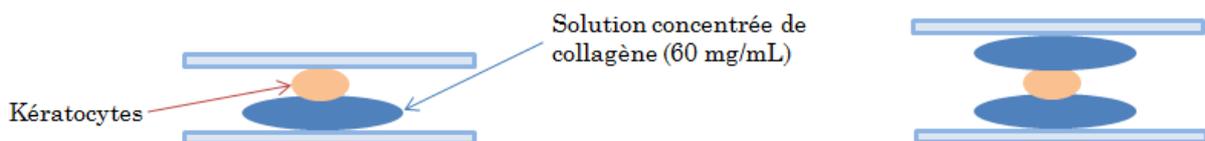


Figure 5-12 : Représentation schématique du quatrième procédé : une suspension cellulaire est placée au dessus d'une solution concentrée à 60 mg/mL de collagène, elle-même au dessus d'une lamelle de verre. On rajoute éventuellement du collagène au-dessus (à droite sur le schéma). Ensuite on vient appuyer légèrement avec une autre lamelle de verre afin de faire rentrer les cellules dans la solution. On essaie de garder une épaisseur suffisamment faible pour que la transparence soit maintenue.

Une variante de cette technique a consisté à placer, dans des plaques 12 puits, des lamelles de plastiques au fond des puits. Le collagène est rajouté avec le culot cellulaire puis l'ensemble mélangé. Il faut ensuite placer une autre lamelle au dessus pour aplatir le mélange, ainsi que du milieu.

5.2.2 Résultats

5.2.2.1 Premier procédé

Les résultats obtenus avec cette technique sont encourageants. En effet, nous avons fait des marquages DAPI sur des morceaux de gels au premier jour, au septième et au quatorzième. A chaque fois, ils ont permis de voir que les cellules étaient bien à l'intérieur du gel et à différents endroits. La Figure 5-13 montre le DAPI réalisé sur des morceaux de gels différents pris à trois temps différents. Le noyau apparaît en blanc. En changeant la focalisation du microscope à fluorescence, on peut s'apercevoir que des cellules sont présentes à différentes profondeurs dans le gel. En outre, on a observé, sur plusieurs morceaux à J14, un plus grand nombre de noyaux cellulaires, ce qui peut être signe d'une prolifération. Cependant cette technique, notamment du fait de la présence de soude afin de neutraliser le milieu, ne paraît pas idéale. La solution de collagène de départ est diluée deux fois et la concentration devient donc relativement faible (20-30 mg/mL). Ensuite, du fait de son mélange avec le milieu de culture et la soude (ce qui ramène le pH aux alentours du pH physiologique) induit rapidement, même à froid, la fibrillogenèse. Ainsi le temps offert pour concentrer la solution après ajout des cellules est très court. La solution avait tendance alors à fibriller localement pendant la centrifugation à froid ce qui rendait impossible un moulage *a posteriori*.



Figure 5-13 : Dapi sur des gels (environ 30 mg/mL) de collagène à trois temps différents. Les noyaux des cellules sont en blanc. Il semble y avoir de façon systématique plus de noyaux à J14.

Ajouté à cela, la solution devenait totalement opaque (peut-être du fait de son épaisseur également) dans l'étuve à 37°C avec le milieu.

Malgré cela, au vu des résultats fournis par le DAPI, nous avons tenté de nous soustraire à l'étape de neutralisation de la solution de collagène avant ajout des cellules. Ainsi la solution de départ est plus concentrée, mais se pose le problème de la survie cellulaire en milieu acide.

5.2.2.2 Second procédé

Le second procédé consiste à ajouter au dessus d'une solution de collagène un culot cellulaire et de centrifuger le tout afin de faire rentrer et les cellules dans la solution et si besoin, de concentrer d'avantage la solution. Après centrifugation (environ 1h à 2000 rpm) avec cellules la solution est moulée sous forme de pièce de monnaie en présence de milieu de culture et à 37°C. Il est important de noter qu'à condition de mouler une pièce très fine, la matrice fibrillée restait transparente dans ces conditions malgré le processus différent de fibrillogenèse. En effet les nombreux sels présents dans le milieu de culture, nécessaires pour les cellules, ont tendance à provoquer une déshydratation de la matrice et à la rendre moins transparente. Les coupes histologiques montrent quelques cellules encapsulées, mais à proximité de la surface, sur laquelle les autres cellules sont majoritairement localisées (Figure 5-14).

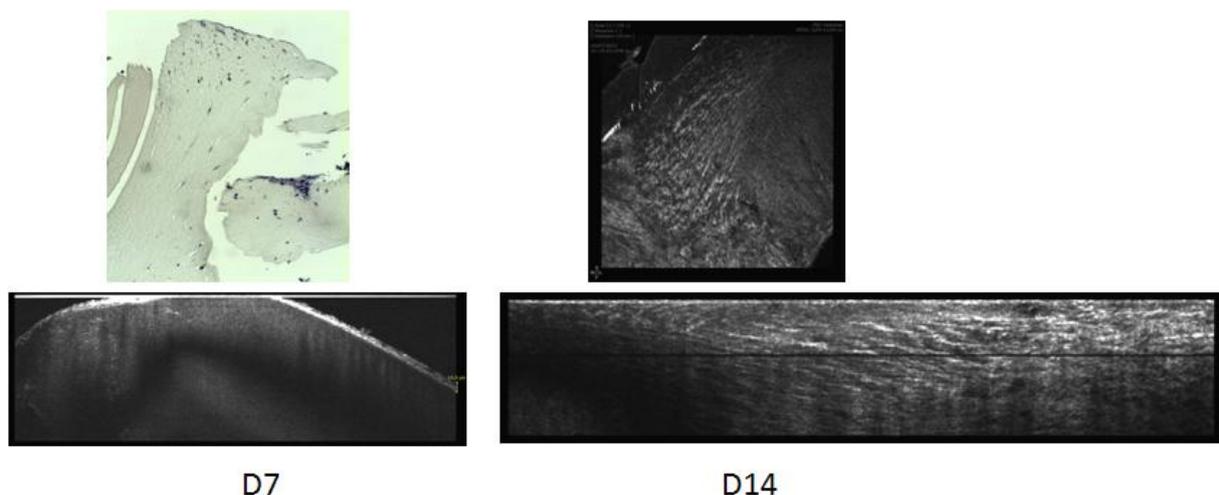


Figure 5-14 : A gauche : coupe histologique sur laquelle on peut observer la localisation, principalement à la surface, des kératocytes et image OCT illustrant le même phénomène à J7. A J14, à droite, on observe une prolifération de cellules à la surface et l'image OCT dans l'épaisseur laisse suggérer la présence de cellules à l'intérieur à proximité immédiate de la surface.

La microscopie FFOCT montre également que les cellules sont surtout en surface que ce soit à J7 ou J14. On ne note pas de pénétration de cellules à l'intérieur ce qui semble plutôt logique compte tenu de la concentration du gel d'au moins 40 mg/mL. Ceci est peut être lié au temps de centrifugation trop court ou bien à la vitesse trop faible pour faire pénétrer les cellules en profondeur dans la solution, mais il est compliqué d'évaluer

la vitesse maximale à laquelle il est possible de procéder sans porter atteinte à la survie cellulaire et il en va de même pour la durée de centrifugation.

On notera tout de même que les cellules présentent bien la forme caractéristique des kératocytes du stroma.

La variante du procédé numéro 2, dans les petits tubes de centrifugation, fournit des résultats similaires.

5.2.2.3 Troisième procédé

Il est similaire au deuxième mais les cellules sont en sandwich entre deux solutions identiques de collagène. Les résultats sont aussi très similaires comme le montre la figure 12. Que ce soit en ajoutant uniquement le culot cellulaire ou bien une suspension cellulaire de 100 μ L, si les cellules semblent bien encapsulées, elles ne prolifèrent pas et restent confinées en de rares endroits du gel, bien qu'ayant la forme adéquate (Figure 5-15).

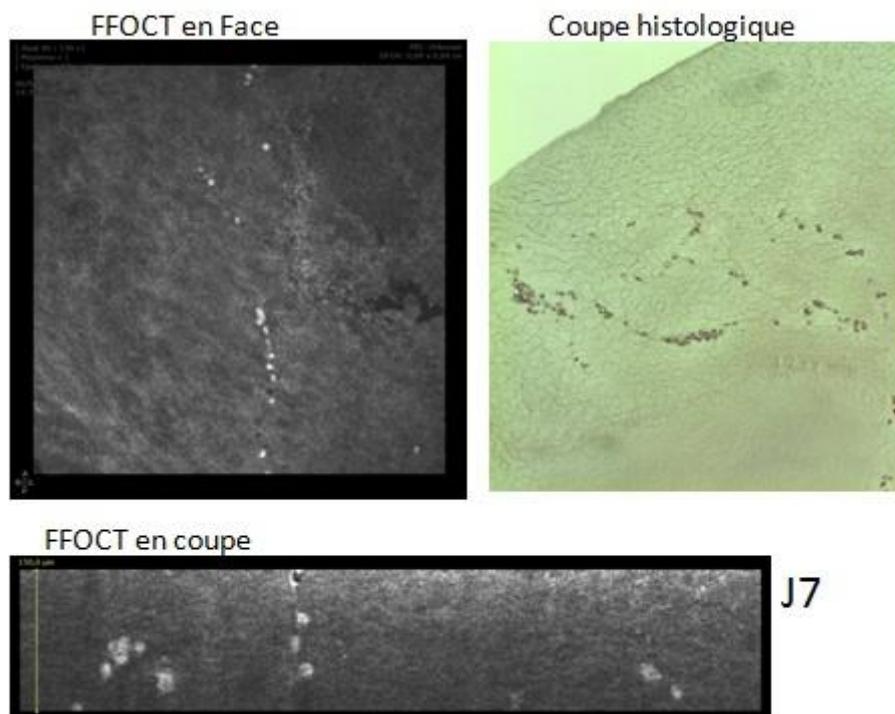


Figure 5-15 : FFOCT vu de dessus et en coupe du gel avec les kératocytes. Les quelques cellules encapsulées survivent dans le gel ce qu'on peut voir sur la coupe histologique.

Il est cependant très intéressant de remarquer que les cellules, bien qu'en faible nombre, survivent à l'intérieur du gel et surtout résistent aux conditions acides. De plus, les immunomarquages montrent que les cellules expriment le bon phénotype comme le montre la Figure 5-16 avec en vert le collagène, en rouge la vimentine et en bleu le

noyau des cellules. La microscopie de fluorescence montre aussi qu'il y a peu de cellules à l'intérieur de la matrice, mais que celles qui s'y trouvent n'y meurent pas.

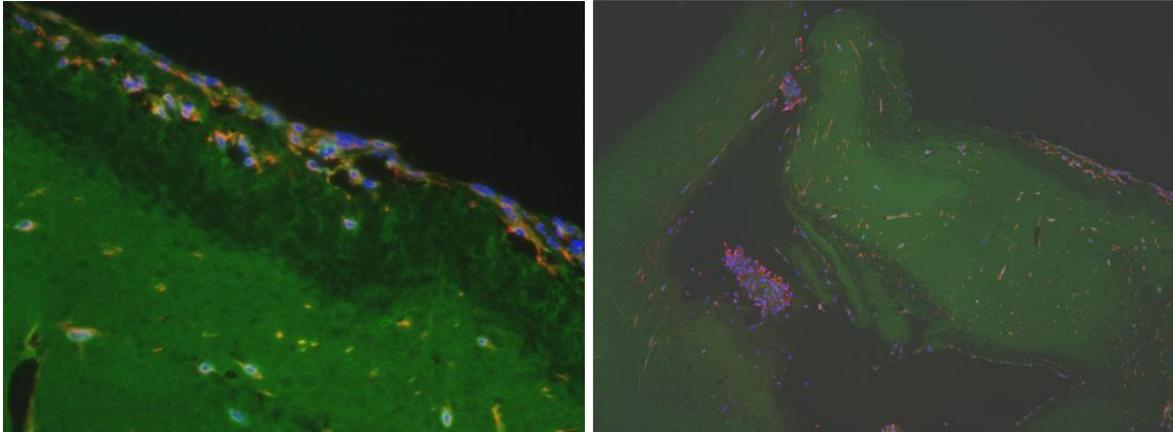


Figure 5-16 : Immunomarquages (J7) sur des matrices réalisées selon le troisième procédé avec kératocytes intégrés. En vert apparaît le collagène, en rouge la vimentine, signe du bon phénotype exprimé par les cellules, et en bleu les noyaux.

5.2.2.4 Quatrième procédé

A ce jour, il est celui qui a fourni les résultats les plus prometteurs.

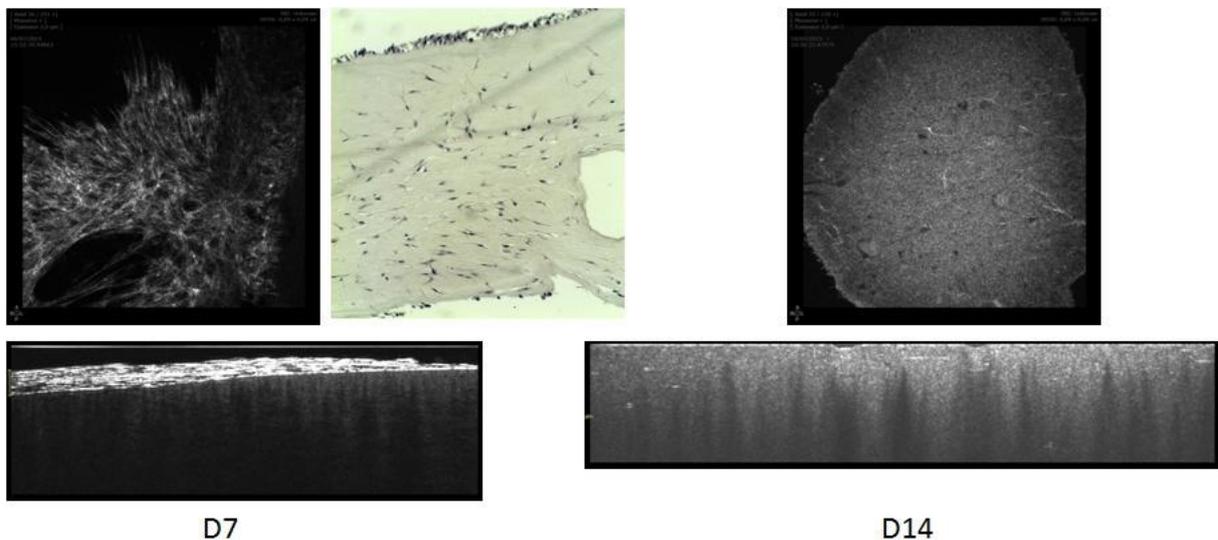


Figure 5-17 : A gauche : FFOCT vu de dessus et en coupe et coupe histologique au milieu du gel. On voit clairement sur la coupe histologique la présence interne des cellules à J7. On voit également la présence de bon nombre de cellules à la surface qui prolifèrent. A J14 la FFOCT en coupe témoigne (longues striations plus claires) d'une prolifération à l'intérieur de la matrice des kératocytes.

Il apparaît grâce à cette technique que les cellules sont à l'intérieur de la matrice dans presque toute l'épaisseur. En outre, elles semblent proliférer dans la matrice qui est

restée transparente (Figure 5-17). La forme allongée des cellules montre également qu'elles se comportent bien. Les cellules intégrées expriment aussi le bon phénotype comme le montre la Figure 5-18 où l'on peut voir le marquage de la vimentine en rouge (et le DAPI en bleu) réalisé à J7.

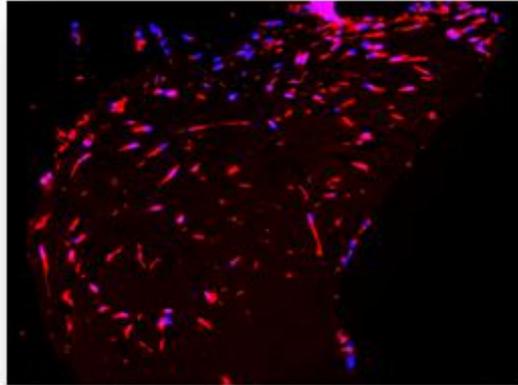


Figure 5-18 : Immunomarquages sur des matrices avec kératocytes, réalisées selon le quatrième procédé. On voit en rouge la vimentine et en bleu le Dapi. Les cellules expriment le bon phénotype dans toute l'épaisseur de la matrice.

A titre de comparaison, voici les mêmes marquages réalisés sur une véritable cornée :

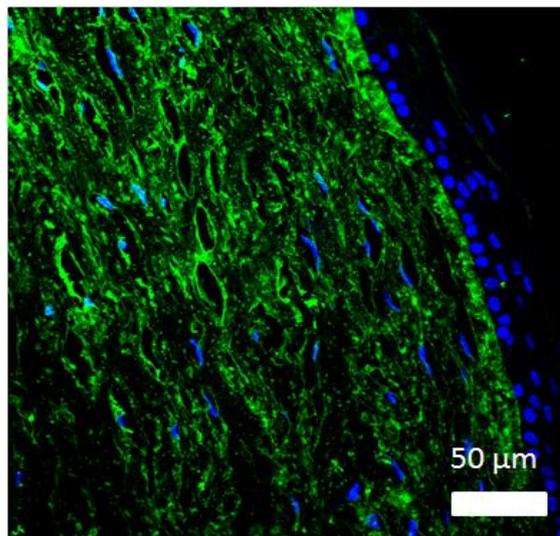


Figure 5-19 : Immunomarquages réalisés sur une vraie cornée avec en vert la matrice extracellulaire et en bleu le noyau des cellules stromales.

Ce procédé a donc permis d'encapsuler avec succès les kératocytes dans une matrice de collagène concentrée et qui a gardé sa transparence lors du processus de fibrillogenèse à

37°C en présence de milieu de culture. Le nombre de cellules encapsulées était assez élevé (10000 cellules dans la suspension cellulaire) afin de compenser les pertes lors de la mise en forme de la matrice.

Les cellules semblent avoir proliféré dans le temps et colonisé l'épaisseur de la matrice et assimilé les conditions acides au moment de la mise en forme de la matrice. Ceci est un point très important à soulever. Les cellules lors de la mise en forme de la matrice sont mises au contact de la solution de collagène de pH égale à 3,20. Nous avons pensé à conditionner les cellules stromales pour qu'elles survivent à ce choc acide. Ainsi, durant les jours précédents l'expérience, le pH du milieu dans lesquelles elles proliféraient en boîte de culture était abaissé progressivement pour atteindre un pH de 4. Il a été très intéressant de constater que l'ensemble des cellules semblait supporter cet abaissement de pH. La survie des cellules à l'encapsulation dans la solution de collagène est certainement liée à ce pré-conditionnement.

5.3 Cellules endothéliales

5.3.1 Cellules endothéliales HUVECS

Une autre étape dans la caractérisation des matrices du point de vue biologique a été de vérifier que les matrices ne permettaient pas la croissance de vaisseaux sanguins. Ainsi nous avons mis en culture des cellules endothéliales de cordon ombilical appelées HUVECS et qui, sous certaines conditions, sont à mêmes de rentrer à l'intérieur de matrices de collagène pour commencer à former des capillaires, prémices de la formation des premiers vaisseaux sanguins. Cette expérience a été effectuée au CIRB (Collège de France avec la collaboration de L. Muller et L. Bidault)

5.3.2 Protocole expérimental

Différentes solutions ont été utilisées pour procéder à cette expérience. Des solutions de condition 23 (10 mM acide acétique-0,3 mM HCl) à 3 et 90 mg/mL et des solutions à 3 mg/mL de collagène dans de l'acide acétique 500 mM (qui est la solution directement issue de la purification). Les solutions (environ 100 µL) sont placées dans des plaques 24 puits avec des « transwell » qui permettent de procéder à un meilleur rinçage des gels une fois fibrillés sous vapeur d'ammoniaque et également, si souhaité, de mettre deux milieux de culture différents de sorte à attirer les cellules vers l'intérieur des gels. Après fibrillogenèse, les gels sont donc rincés durant 2 semaines pour être certains d'avoir éliminé totalement les molécules d'ammoniaque. Dans un premier temps les gels sont lavés à l'eau car un premier rinçage au PBS 1x provoque une opacification des gels en raison des nombreux sels présents. L'épaisseur des gels à 90 mg/mL est tout de même variable en raison de la difficulté de mettre un volume précis dans les puits. Après le rinçage à l'eau on procède au rinçage au PBS 1x pendant plusieurs jours. Une très légère

baisse de la transparence est constatée pour les gels de conditions 23. Ceux à 3 mg/mL de collagène dans de l'acide acétique 500 mM sont totalement opaques en raison du diamètre important des fibrilles (Figure 4-12). On cherche ainsi à voir si les HUVECs vont se comporter différemment en fonction de la morphologie des fibrilles.

Un gel contrôle, connu pour permettre le développement de capillaires en son sein, est également synthétisé.

Une fois les rinçages terminés, les gels sont chargés avec du milieu conditionné issu de NHDF en présence de 10 ng/mL de VEGF et de primocyne, afin d'éviter les contaminations. S'ensuit l'ensemencement des gels avec 40 000 cellules/m² de sorte à atteindre la confluence. Le milieu utilisé est du milieu EGCM2. L'incubation s'étend ensuite sur 2 semaines avant de fixer les gels avec du PFA 4%.

5.3.3 Résultats

Quel que soit le gel, les HUVECs apparaissent vivantes à la surface du matériau mais il n'y a aucun signe de pénétration verticale des cellules. Sur les gels les plus concentrés, comme celui présenté sur la Figure 5-20, il semble même y avoir une « deuxième épaisseur » de cytoplasme. La vue en coupe (Figure 5-20B) montre bien l'absence de pénétration dans le gel.

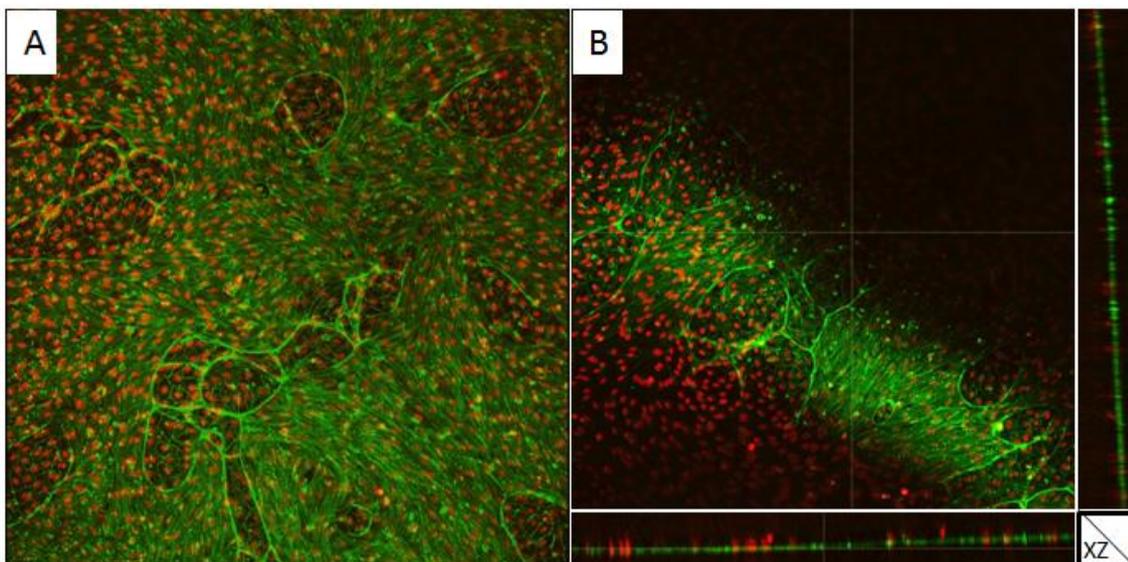


Figure 5-20 : Vue de dessus (A) et en coupe (B) d'un gel à 90 mg/mL de la condition 23 avec les HUVECs. Le cytoplasme est marqué à la phalloïdine (en vert) et les noyaux en rouge. Les gels ont été observés sur un microscope à fluorescence en sortant les gels des puits.

Concernant les gels à 3 mg/mL, aucune différence notable n'a été observée entre ceux de la condition 23 et ceux synthétisés à partir d'une solution dans l'acide acétique 500 mM

qui fournit des fibrilles de diamètre bien plus important, de l'ordre de la centaine de nanomètres. Dans la condition 500mM, il n'y a pas de pénétration également, mais quelques protusions cellulaires (Figure 5-21).

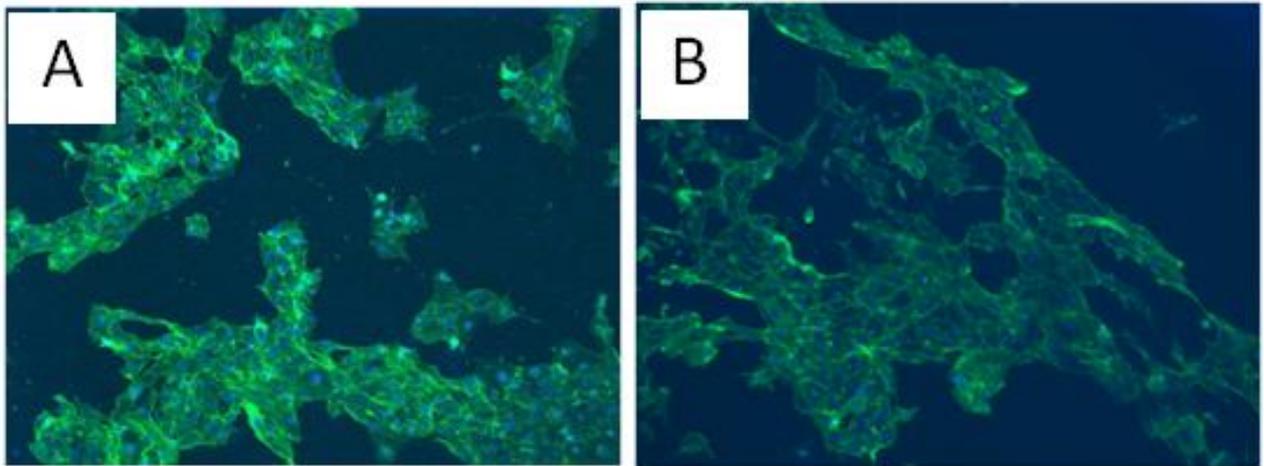


Figure 5-21 : Gel à 3mg/mL dans la condition acide acétique 500 mM (A) et dans la condition 23 (B). On note la colonisation non homogène des matériaux dans ces conditions.

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu voir que les matrices transparentes permettent la croissance de cellules épithéliales à partir d'un explant limbique. Celles-ci expriment le bon phénotype et se développent sur l'ensemble de la matrice en 14 jours de culture. La formation de colonies confirme le caractère "cellule souche" des cellules puisqu'elles expriment les marqueurs CK3 et p63 α . En outre, il apparaît que les matrices à 90 mg/mL (de la condition 23 notamment) supportent mieux la croissance des cellules épithéliales que la membrane amniotique qui sert de contrôle.

Nous avons également pu constater qu'il est possible d'encapsuler avec succès des cellules souches stromales qui se différencient en kératocytes, c'est-à-dire le type cellulaire qu'on trouve dans le stroma cornéen, dans la matrice. En effet, elles expriment la vimentine, marqueur des cellules kératocytaires. L'idée est là d'inclure tous les types cellulaires de la cornée dans le processus de fabrication de la cornée artificielle.

Points clés du chapitre 5 :

- **formation d'un épithélium sur les matrices à partir de l'explant limbique**
- **Les cellules épithéliales se comportent aussi bien sur la matrice que sur les membranes amniotiques couramment utilisées pour traiter des cornées endommagées**
- **les cellules épithéliales expriment le bon phénotype**
- **les cellules endothéliales HUVECs ne rentrent pas à l'intérieur de la matrice et donc n'y développent pas de vaisseaux sanguins.**
- **possibilité d'encapsuler des cellules souches stromales dans une solution concentrée et de créer une matrice avec cellules intégrées. Les cellules se différencient bien en kératocytes**

6 Conclusion générale

Ce travail de thèse a consisté à utiliser les propriétés cristal-liquides du collagène de type I afin d'obtenir un matériau organisé pour développer une cornée artificielle, permettant le développement des différents types cellulaires trouvé *in vivo*.

Pour cela, deux approches ont été utilisées, se différenciant l'une de l'autre dans la manière de concentrer le collagène. La première approche nous a permis de générer les matériaux transparents. Dans cette approche, le collagène a été concentré par centrifugation-filtration, ce qui nous a permis de préparer des solutions organisées prêtes à être moulées. La deuxième approche nous a permis d'étudier les phases cristal-liquide générées par les conditions physico-chimiques ayant donné les matrices présentant les meilleures transparences. Cette approche a fait usage de microcellules en verre construites au laboratoire. Dans ces microcellules le collagène est concentré par une injection continue et contrôlée de collagène compensant l'évaporation.

Le couplage des deux approches nous a permis de sélectionner une condition répondant au mieux aux critères de transparence et d'organisation. Il est évident que les deux méthodes de concentration sont différentes et qu'en conséquence, la condition physico-chimique n'est pas précisément la même entre la condition qui présente la phase contreplaqué d'intérêt au sein de la microcellule et celle de la solution moulée pour former la matrice. Néanmoins, cette procédure nous est apparue comme la plus rationnelle et, finalement, les matrices présentent localement des domaines organisés en contreplaqués plus ou moins bien marqués.

Ainsi, la stratégie du projet a été de tester tout d'abord, pour la transparence des matrices obtenues, différentes conditions physico-chimiques (définies par les concentrations en acides acétique et chlorhydrique) de solutions de collagène. Après fibrillogenèse, les transparences ont été mesurées pour chacune de ces conditions et pour différentes concentrations en collagène. On a pu observer que la transparence évoluait lors des deux premières semaines après la synthèse des matrices, et qu'il convenait donc d'attendre ce temps avant d'utiliser les matrices pour la culture cellulaire ou les essais mécaniques. En outre, la transparence diminuait avec la concentration en collagène ce qui nécessitait de trouver un premier équilibre entre la concentration et la transparence. La transparence des matrices devenant inférieure à la transparence de la cornée humaine au voisinage de 120 mg/mL, nous avons donc choisi de travailler à 90 mg/mL.

Les conditions permettant d'avoir des matrices transparentes (environ 90%) à 90 mg/mL ont été finalement retenues afin d'analyser la phase cristal-liquide associée à chacune d'entre elles.

Nous avons ainsi montré qu'il existe une condition physico-chimique (10 mM en acide acétique et 0,3 mM en acide chlorhydrique) qui fournit une phase cristal-liquide organisée en contreplaqué, correspondant justement à l'organisation des fibrilles de collagène dans le stroma cornéen. Nous avons aussi pu voir que les conditions donnant des matrices transparentes ne sont pas forcément associées à cette organisation en contreplaqué puisque bon nombre d'entre elles produisent des phases cristal-liquides cholestériques. La phase cristal-liquide en contreplaqué a été précisément caractérisée grâce à la microscopie à génération de seconde harmonique par comparaison avec l'étude des cornées humaines. Les modèles théoriques réalisés et les résultats obtenus sont en bonne adéquation puisque les franges découlant des expériences (profils de l'orientation des molécules dans le plan de l'image, profils en intensité et rapport d'anisotropie) sont similaires aux franges théoriques.

En outre, des mesures préliminaires de rhéologie montrent qu'il y a des différences très nettes dans la réponse de solutions obtenues selon différentes conditions et que la solution en contreplaqué donne des modules $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ plus élevés que les solutions cholestériques. L'analyse des résultats nous a conduit à émettre l'hypothèse que les solutions denses de collagène donnant des contreplaqués se comportent comme un matériau de type vitreux-mou, comme les solutions donnant un cholestérique. Par contre, il semble qu'elles possèdent un caractère plus cohésif. Ceci signifie, du point de vue structural, que des domaines organisés (en contreplaqué) se retrouveraient dans une matrice désorganisée. Ces résultats préliminaires demandent à être confirmés par des expériences complémentaires.

La condition 23 (10 mM AA, 0,3 mM HCl) a donc été retenue pour synthétiser les matrices dans le but de faire des cornées artificielles.

En induisant la fibrillogénèse des solutions organisées avec la condition donnant le contreplaqué, nous avons pu vérifier que l'organisation de la phase cristal-liquide était localement conservée. Ce résultat était attendu par l'expérience déjà acquise sur les matrices issues de solution cholestérique.

Les matrices obtenues avec la condition 23 (10 mM AA, 0,3 mM HCl) sont parmi les plus transparentes à 90 mg/mL (entre 85 et 90 %) dans le domaine de 300 à 800 nm. Cette transparence est principalement due aux faibles diamètres des fibrilles et à une inter-distance régulière entre ces fibrilles. Par observation au microscope électronique, le diamètre des fibrilles composant ces matrices a été estimé à environ 10-15 nm ce qui est inférieur au diamètre moyen des fibrilles de la cornée humaine qui est de l'ordre de 35 nm. Le pas du contreplaqué dans les matrices est variable mais semble être compris entre 400 et 800 nm alors que dans la cornée, l'épaisseur d'une lamelle est d'environ 2 μm . En ce qui concerne les propriétés mécaniques, les matrices ont un module d'Young de quelques centaines de kPa, que ce soit avec des matrices organisées en cholestérique ou en contreplaqué. Cependant, la valeur moyenne obtenue pour les matrices en contreplaqué est supérieure et approche 1 MPa alors que la cornée a un module d'Young

de l'ordre de 3 MPa. Ainsi, nos matrices, bien qu'en l'absence de cross-linker, présentent plutôt de bonnes propriétés mécaniques. Les propriétés mécaniques pourraient être améliorées en augmentant la concentration en collagène, mais ce serait au détriment de la transparence. C'est un autre équilibre à trouver. Les matrices doivent être suffisamment concentrées pour être organisées et avoir de bonnes propriétés mécaniques, mais sans excès pour qu'elles conservent de bonnes propriétés optiques.

Les matrices ont aussi donné des résultats encourageants du point de vue biologique. Nous avons voulu vérifier le comportement de différents types cellulaires engagés dans la cornée. Les cellules en provenance d'un explant limbique suturé à la surface des matrices les ont bien colonisées et ont exprimé le phénotype caractéristique des cellules épithéliales de cornée. Ainsi, l'épithélium, la première couche de la cornée, se reconstruit bien sur les matrices. Nous avons aussi montré qu'il est possible d'inclure les cellules souches stromales dans le processus de fabrication des matrices en faisant fibriller les solutions à 37°C et en présence de milieu de culture, après y avoir inséré les cellules qui vont ensuite se différencier en kératocytes. Là aussi, il y a un équilibre à trouver entre la concentration en collagène et l'intégration des cellules. Il a également été vérifié que les vaisseaux sanguins ne peuvent se développer, *in vitro*, dans les matrices. Nous avons aussi tenté de cultiver des cellules endothéliales de cornée sur les matrices mais ceci n'a malheureusement pas abouti car les cellules provenant d'un endothélium cornéen se sont différenciées en fibroblastes. Il serait intéressant de réussir à créer une matrice avec des kératocytes encapsulés et sur laquelle serait recréé un épithélium d'un côté et un endothélium de l'autre.

Tous ces résultats sont encourageants et montrent le fort potentiel de la méthode employée pour créer une cornée artificielle implantable. Il y a bien sûr plusieurs points à améliorer de la structure aux propriétés mécaniques. Il existe une différence entre la solution de collagène concentrée dans les microcellules pour étudier les phases cristallines et celle concentrée par centrifugation-filtration bien qu'elles soient identiques au départ. Ainsi, il serait utile de pouvoir déterminer avec précision la condition physico-chimique exacte dans laquelle se trouvent les solutions dans les microcellules dans les zones d'intérêt (organisation, pas). De fait, on serait certain que la solution que l'on concentre afin de créer une matrice, a exactement la même condition que celle qui donne le contreplaqué en microcellule. L'épaisseur des matrices est aussi un point essentiel à contrôler. En effet, lors de la fibrillogenèse, le phénomène de synérèse entraîne une diminution de l'épaisseur des matrices qui regonflent dans l'eau milli-Q où elles sont placées après la fibrillogenèse. Cependant, l'épaisseur ne revient pas à la valeur d'origine (500 µm) et la variabilité de l'épaisseur est assez importante. Concernant la microstructure, il serait intéressant de trouver une méthode permettant d'avoir de plus larges domaines organisés au sein des matrices et d'en contrôler la taille. On pourrait ainsi faire des matrices avec des zones de domaines plus ou moins grands car, dans la cornée humaine, la taille moyenne des domaines est plus grande du côté postérieur que du côté antérieur. On pourrait par exemple combiner différentes conditions physico-

chimiques. Le pas du contreplaqué gagnerait aussi à être contrôlé pour créer des couches de fibrilles parallèles d'une épaisseur plus proche de celle de la cornée humaine. Pour cela il faudrait connaître la concentration exacte de la solution, grâce à la SHG et à la fluorescence excitée à deux photons, au niveau des zones dont le pas correspond à celui de la cornée humaine. Finalement, des mesures complémentaires s'imposent en rhéologie afin de comprendre les observations faites sur nos expériences.

Enfin, les matrices semblent prêtes pour des essais *in vivo* qui constituent la suite logique et nécessaire de ce travail, afin de déterminer le potentiel effectif des matrices développées.

Bibliographie

Ahmad ... Bouligand

- Ahmad S., Stewart R., Yung S., Kolli S., Lako M., Armstrong L., Tojkovic S., Figueiredo F., (2007). Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*. **25**:1145–1155.
- Al-Aqaba M. A., Fares U., Suleman H., Lowe J., Dua H. S., (2010). Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol*. **94**(6):784-789
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1996). *The Art of MBOC3 : The Complete Set of Figures from Molecular Biology of the Cell*, Publisher Taylor & Francis Inc, Garland Publishing Inc
- Allouch-Nahmias C., Goldschmit P., Borderie V., Touzeau O., Gaujoux T., Laroche L., Goemaere I., Rault J., *Anatomie de la cornée, Ophatmomologie*, Elsevier Masson, 2011
- Aptel F., Olivier N., Deniset-Besseau A., Legeais J.-M., Plamann K., Schanne-Klein M.-C., Beaurepaire E., (2010). Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **51**:2459–2465.
- Arevalo C.R., Urbach J.S., Blair D.L., Size-Dependent Rheology of Type-I Collagen Networks, (2010). *Biophysical Journal* **99**, L65–L67
- Aucoin L., Griffith C. M., Pleizier G., Deslandes Y., Sheardown H. (2002). Interactions of corneal epithelial cells and surfaces modified with cell adhesion peptide combinations. *J. Biomater. Sci. Polym*. **13**:447-462.
- Auger F. A., Remy-Zolghadri M., Grenier G., Germain L. (2002). A truly new approach for tissue engineering: the LOEX self-assembly technique. *Ernst Schering Res. Found. Workshop*, 73-88.
- Bancelin S., (2013). Thèse Imagerie Quantitative du Collagène par Génération de Seconde Harmonique, (Ecole Polytechnique)
- Bareiss, B., Ghorbani, M., Li, F., Blake, J. A., Scaiano, J. C., Zhang, J., et al. (2010). Controlled release of acyclovir through bioengineered corneal implants with silica nanoparticle carriers. *Open Tissue Eng. Regen. Med. J* **3**:10-17.
- Bella J., Brodsky B., Berman H.M., (1996). Disrupted collagen architecture in the crystal structure of a triple-helical peptide with a Gly->Ala substitution, *Connective Tissue Research*, **35**: (1-4), 401-406. doi: 10.3109/03008209609029218
- Besseau L., Giraud-Guille M-M., (1995). Stabilization of fluid cholesteric phases of collagen to ordered gelled matrices, *Journal of molecular biology*, **251**(11):197-202. doi : 10.1006/jmbi.1995.0426.
- Borderie V.M., Scheer S., Touzeau O., Védie F., Carvajal-Gonzalez S., Laroche L., (1998). Donor organ cultured corneal tissue selection before penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* **82**:382–388
- Borderie V.M., Boelle P.Y., Touzeau O., Allouch C., Boutboul S., Laroche L., (2009). Predicted long-term outcome of corneal transplantation. *Ophthalmology* **116**:2354-2360.
- Bouligand Y., (1965). Sur une architecture torsadée répandue dans de nombreuses cuticules d'arthropodes. *C. R. Acad. Sci., Paris* **261**:3665-3668.
- Bouligand Y., Soyer M. O., Puiseux-Dao S., (1968). La structure fibrillaire et l'orientation des chromosomes chez les Dinoflagelles. *Chromosoma* **24**:251-287.

- Bouligand Y., Morphogenesis: Origins of Patterns and Shapes, Paul Bourguine & Annick Lesne (éds.), Springer-Verlag, (1978)
- Bruining M.J., Pijpers A.P., Kingshott P., Koole L.H. (2002). Studies on new polymeric biomaterials with tunable hydrophilicity, and their possible utility in corneal repair surgery. *Biomaterials* **23**:1213–1219.
- Calderón-Colón X., Xi Z., Breidenich J.L., Mulreany D. G., Guo Q., Uy O.M., Tiffany J. E., Freund D. E., McCally R. L., Schein O. D., Elisseff J. E., Trexler M. M., (2012). Structure and properties of collagen vitrigel membranes for ocular repair and regeneration applications. *Biomaterials* **33**: 8286-8295.
- Canty E.G., Kadler K.E., 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell. Sci.* **118**:1341–1353.
- Carrier P., Deschambeault A., Talbot M., Giasson C. J., Auger F. A., Guerin S. L., (2008). Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**:1376-1385
- Cassidy J.J., Hiltner A., Baer E., (1989). Hierarchical structure of the intervertebral-disk, *Connective Tissue Research*, **23** (1):75-78. doi: 10.3109/03008208909103905
- Chen D.T.N., Wen Q., Janmey P.A., Crocker J.C., Yodh A.G. (2010). Rheology of Soft Materials, *Annu. Rev. Condens. Matter Phys.*, 1:301–22
- Chew H. F., Ayres B. D., Hammersmith K. M., Rapuano C. J., Laibson P. R., Myers J. S., (2009). Boston keratoprosthesis outcomes and complications. *Cornea* **28**:989-996.
- Chirila T. V., (2001). An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials* **22**:3311-3317.
- Chirila T. V., Barnard Z., Zainuddina, Harkin D. G., Schwab I. R., Hirst L. W., (2008). Bombyx mori silk fibroin membranes as potential substrata for epithelial constructs used in the management of ocular surface disorders. *Tissue Eng. Part A*, **14**:1203-1211.
- Chuo J.Y., Yeung S.N., Rocha G., (2011). Modern corneal and refractive procedures. *Expert Rev. Ophthalmol.* **6**:247–266.
- Claesson M., Armitage W.J., P Fagerholm P., U Stenevi U., (2002). Visual outcome in corneal grafts: a preliminary analysis of the Swedish Corneal Transplant Register. *Br J Ophthalmol* **86**:174–180
- Collomb Elodie, Le tégument des vertébrés et la spécification de l'épithélium cornéen, Thèse de l'Université de Grenoble, 2012.
- Crawford G.J., Hicks C.R., Lou X., Vijayasekaran S., Tan D., Mulholland B., Chirila T.V., Constable I.J., (2002). The Chirila keratoprosthesis: phase I human clinical trial. *Ophthalmology* **109**:883–889.
- Crawford G.J., Eguchi H., Hicks C.R., (2005). Two cases of AlphaCor surgery performed using a small incision technique. *Clin. Exp. Ophthalmol* **33**:10–15
- Daxer A., Misof K., Grabner B., Ettl A., Fratzl P., 1998a. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**:644–648.

- Daxer A., Misof K., Grabner B., Ettl A., Fratzl P., 1998b. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**:644–648.
- Débarre D., Supatto W., Pena A.-M., Fabre A., Tordjmann T., Combettes L., Schanne-Klein M.-C., Beaurepaire E., (2006). Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat Meth* **3**:47–53.
- Deniset-Besseau A., De Sa Peixoto P., Mosser G., Schanne-Klein M. C., (2010), *Opt. Express* **18**(2):1113–21.
- Diamant J., Keller A., Baer E., Litt M., Arridge R.G., (1972). Collagen: ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **180**(1060):293-315.
- 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** (2):71-82
- Doane M.G., Dohlman C.H., Bearn G., (1996), Fabrication of a keratoprosthesis. *Cornea* **15**(2):179-182.
- Dohlman C. H., Grosskreutz C. L., Chen T. C., Pasquale L. R., Rubin P. A., Kim E. C., (2010). Shunts to divert aqueous humor to distant epithelialized cavities after keratoprosthesis surgery. *J. Glaucoma* **19**:111-115.
- Dravida S., Gaddipati S., Griffith M., Merrett K., Lakshmi S., Sangwan V. S., (2008). A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: promising alternative for clinical transplantation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2**:263-271.
- Du Y., Carlson E. C., Funderburgh M. L., Birk D. E., Pearlman E., Guo, N., (2009). Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas. *Stem Cells*, **27**:1635-1642.
- Dua H.S., Forrester J.V., (1990) The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol* **110**:646–656.
- Duan X., Sheardown H. (2005). Crosslinking of collagen with dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **75**:510-518.
- Duan X., Sheardown H. (2006). Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions. *Biomaterials*, **27**:4608-4617.
- Ebato B., Friend J., Thoft R.A., (1988). Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Investigative ophthalmology & visual science* **29**:1533-1537
- Ehlers N., Hjortdal J., 2005. The Cornea: Epithelium and Stroma, in: Fischbarg, J. (Ed.), *Advances in Organ Biology, The Biology of the Eye*. Elsevier, pp. 83–111.
- Fagerholm P., Lagali N. S., Merrett K., Jackson W. B., Munger R., Liu Y., Polarek J.W., Söderqvist M., Griffith M., (2010). A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a Phase 1 clinical study. *Sci. Transl. Med* **2**:46-61. doi: 10.1126/scitranslmed.3001022
- Falcinelli G., Falsini B., Taloni M., Colliardo P., (2005). Modified osteo-odonto-keratoprosthesis for treatment of corneal blindness: long-term anatomical and functional outcomes in 181 cases. *Arch. Ophthalmol.* **123**:1319-1329.

- Feng Y., Simpson T.L. (2008). Corneal, limbal, and conjunctival epithelial thickness from optical coherence tomography. *Optom Vis Sci* **85**:E880-E883
- Fernandes P., (2008). *Nouvelles études structurales de cristaux liquides par réflectivité et diffraction résonante des rayons X*, Thèse de l'Université Bordeaux 1.
- Fini M.E., (1999). Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res* **18**:529-551.
- Fratzl P., "Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction" in Collagen, Structure and Mechanics, Fratzl P. (Editeur). Springer, 2008 ISBN : 978-0-387-73905-2
- Friedel G., (1922), *Annales de Physique* **18**:273–474
- Fung Y.C., *A first course in Continuum Mechanics*, Prentice-Hall, Englewoods Cliffs, N.J. (1969)
- Gagnon N., Auger F., Germain L., (2005). Porcine corneal endothelial cell culture improvement: effect of initial seeding density and presence of a feeder layer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, E-Abstract 5006.
- Garzón I., Martín-Piedra M.A., Alfonso-Rodríguez C., González-Andrades M., Carriel V., Martínez-Gómez C., Campos A., Alaminos M., (2014). Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **55**(7):73-83. doi: 10.1167/iovs.14-14304.
- Gaudreault M., Carrier P., Larouche K., Leclerc S., Giasson M., Germain L., (2003). Influence of sp1/sp3 expression on corneal epithelial cells proliferation and differentiation properties in reconstructed tissues. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**:1447-1457.
- Germain L., Auger F. A., Grandbois E., Guignard R., Giasson M., Boisjoly H., (1999). Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* **67**:140-147.
- Ghoubay-Benallaoua D., Basli E., Goldschmidt P., Pecha F., Chaumeil C., Laroche L., (2011). Human epithelial cell cultures from superficial limbal explants, *Mol Vision*, **17**:341-354
- Ghoubay-Benallaoua, D., Sandali O., Goldschmidt P., Borderie V., (2013). Kinetics of Expansion of Human Limbal Epithelial Progenitor Cells in Primary Culture of Explants Without Feeders. *PLoS ONE* **8**, e81965. doi:10.1371/journal.pone.0081965
- Giraud-Guille M.M., (1988). Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif. Tissue Int.* **42**:167–180.
- Giraud-Guille M.-M., (1989). Liquid Crystalline Phases of Sonicated Type I Collagen, *Biology of the Cell* **67**:97-101.
- Giraud-Guille M.M. (1992), Liquid crystallinity in condensed type I collagen solutions: A clue to the packing of collagen in extracellular matrices, *Journal of Molecular Biology* **224** (3):861-873
- Giraud-Guille M.M., Besseau L., (1998). Banded Patterns in Liquid Crystalline Phases of Type I Collagen: Relationship with Crimp Morphology in Connective Tissue Architecture, *Connect Tissue Res.* **37**(3-4):183-93.
- Giraud-Guille M.-M., Mosser G., Belamie E., (2008). Liquid crystallinity in collagen systems in vitro and in vivo, *Curr. Opin. Colloid In.* **13**(4):303–313.
- Gobeaux Frédéric, Phases denses de collagène de type I : transition isotrope / cholestérique, fibrillogenèse et minéralisation. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007

Gobeaux ... Hicks

- 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**(11):6411–6417.
- Gobeaux F., Mosser G., Anglo A., Panine P., Davidson P., Giraud-Guille M.-M., Belamie E., (2008). Fibrillogenesis in dense collagen solutions: a physicochemical study. *Journal of molecular biology* **376**:1509–1522
- Gobeaux F., Belamie B., Mosser G., Davidson P., Asnacios S., (2010), Power law rheology and strain-induced yielding in acidic solutions of type I-collagen, *Soft Matter*, **6**:3769–3777
- Gomaa A., Comyn O., Liu C., (2010). Keratoprostheses in clinical practice—A review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **38**:211–224.
- Griffith M., Osborne R., Munger R., Xiong X., Doillon C. J., Laycock N. L., (1999). Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* **286**:2169-2172.
- Griffith M., Hakim M., Shimmura S., Watsky M. A., Li F., Carlsson D., Doillon C. J., Nakamura M., Suuronen E., Shinozaki N., Nakata K., Sheardown H., (2002). Artificial Human Corneas: Scaffolds for Transplantation and Host Regeneration. *Cornea* **21**:S54–S61
- Griffith M., Li F., Lohman C., Sheardown H., Shimmura S., Carlsson D.J., (2005). Tissue engineering of the cornea. *Scaffolding in Tissue Engineering*. CRC Press Boca Raton, FL, USA
- Gross J., Kirk D., (1958). The heat precipitation of collagen from neutral salt solutions: some rate-regulating factors. *J Biol Chem.* **233**(2):355-60.
- Guo X., Hutcheon A. E., Melotti S. A., Zieske J. D., Trinkaus-Randall V., Ruberti J. W. (2007). Morphologic characterization of organized extracellular matrix deposition by ascorbic acid-stimulated human corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**:4050-4060.
- Han B., Schwab I. R., Madsen T. K., Isseroff R. R., (2002). A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea* **21**: 505-510.
- Hassell J.R., Birk D.E., (2010). The molecular basis of corneal transparency. *Exp. Eye Res.* **91**:326–335.
- Hay E.D., (1980). Development of the vertebrate cornea. *International review of cytology* **63**:263-322.
- Hay E.D., Linsenmayer T.F., Trelstad, R.L., von der Mark K., (1979). Origin and distribution of collagens in the developing avian cornea. *Current topics in eye research* **1**:1-35
- Hicks C. R., Crawford G. J., Tan D. T., Snibson G. R., Sutton G. L., Gondhoviardjo, T. D., et al. (2002). Outcomes of implantation of an artificial cornea, AlphaCor: effects of prior ocular herpes simplex infection. *Cornea*, **21**:685-690.
- Hicks C. R., Crawford G. J., Lou X., Tan D. T., Snibson G. R., Sutton G., (2003a). Corneal replacement using a synthetic hydrogel cornea, AlphaCor: device, preliminary outcomes and complications. *Eye (Lond.)* **17**:385-392.
- Hicks C. R., Crawford G. J., Tan D. T., Snibson G. R., Sutton G. L., Downie N., (2003b). AlphaCor cases: comparative outcomes. *Cornea* **22**:583-590.
- Hicks C. R., Chirila T. V., Werner L., Crawford G. J., Apple D. J., Constable I. J., (2004). Deposits in artificial corneas: risk factors and prevention. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **32**:185-191.

- Hodge A.J., Petruska J.A., in *Aspects of Protein Structure*, ed. G.N. Ramachandran (New York: Academic Press, 1963), p. 289
- Hoffman A. S., (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**:3-12.
- Hulmes D.J.S, " Collagen Diversity, Synthesis and Assembly" in *Collagen, Structure and Mechanics*, Fratzl P. (Editeur). Springer, 2008 ISBN : 978-0-387-73905-2
- Ihanamäki T., Pelliniemi L.J., Vuorio E., (2004). Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Progress in Retinal and Eye Research* **23**:403–434.
- Inatomi T., Nakamura T., Kojyo M., Koizumi N., Sotozono C., Kinoshita S., (2006). Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* **42**(5):757-764.
- Iordan A., Duperray A., Gerard A., Grichine A., Verdier C., (2011). Breakdown of cell-collagen networks through collagen remodeling, *Biorheology* **47** , 295 277. doi 10.3233/BIR-2010-0575
- Jaspard E., 2007 “cryofracture” CNRS
- Feng Y., Simpson T.L.,(2005), Comparison of human central cornea and limbus in vivo using optical coherence tomography. *Optom Vis Sci*, **82**(5):416-419.
- Jackson D.S., Fessler J.H., (1955). Isolation and properties of a *collagen* soluble in salt solution at neutral pH, *Nature (London)*, **176**, 69
- Jacob J. T., Rochefort J. R., Bi J., Gebhardt B. M. (2005). Corneal epithelial cell growth over tethered-protein/ peptide surface-modified hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **72**:198-205.
- Jacob J.T., Rochefort J.R., Bi J., Gebhardt B.M., (2005). Corneal epithelial cell growth over tethered-protein/peptide surface-modified hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **72B**:198–205.
- Jester J.V., (2008), Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Seminars in cell & developmental biology* **19**:82-93.
- Jester J.V., Barry P.A., Lind G.J., Petroll W.M., Garana R., Cavanagh H.D., (1994). Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Investigative ophthalmology & visual science* **35**:730-743.
- Johnson G., Jenkins M., McLean K. M., Griesser H. J., Kwak J., Goodman M., (2000). Peptoid-containing collagen mimetics with cell binding activity. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**:612-624.
- Kadler K.E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R.P., (2007). Collagens at a Glance, *J. Cell Science* **120**:1955-1958.
- Kaminski, S. L., Biowski, R., Lukas, J. R., Koyuncu, D., Grabner, G. (2002). Corneal sensitivity 10 years after epikeratoplasty. *J. Refract. Surg.*, **18**:731-736.
- Kenyon K.R., Tseng S.C., (1989). Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* **96**(5):709-22; discussion 722-3.
- Khan, B. F., Harissi-Dagher, M., Pavan-Langston, D., Aquavella, J. V., Dohlman, C. H., (2007). The Boston keratoprosthesis in herpetic keratitis. *Arch. Ophthalmol.*, **125**:745-749.
- Khan B., Dudenhofer E.J., Dohlman C.H.(2001). Keratoprosthesis: an update. *Curr. Opin. Ophthalmol* **12**:282–287.

- Khan A., Schnepfer C. A., Armstrong R. C., (1988). Foam rheology .3. Measurement of shear-flow properties, *J. Rheol.* **32**:69. doi.org/10.1122/1.549964
- Kim M.K., Park I.S., Park, H.D., (2001). Effect of poly(ethylene glycol) graft polymerization of poly(methyl methacrylate) on cell adhesion: in vitro and in vivo study. *J. Cataract. Refract. Surg.* **27**:766–774.
- Kinoshita S., Adachi W., Sotozono C., Nishida K., Yokoi N., Quantock A.J., Okubo K. (2001). Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Progress in retinal and eye research*, **20**:639-673.
- Kobayashi H., Ikada Y., (1991). Corneal cell adhesion and proliferation on hydrogel sheets bound with celladhesive proteins. *Curr. Eye Res.*, **10**:899-908
- Komai Y., Ushiki T., (1991). The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**:2244–2258.
- Klenkler B.J., Griffith M., Becerril C., West-Mays J.A., Sheardown,H., (2005)..EGF-grafted PDMS surfaces in artificial cornea applications. *Biomaterials* **26**:7286–7296.
- Kouwer P.H.J., Jager W.F., Mijs W.J., Picken S.J., (2003). Specific interactions in discotic liquid crystals, *Journal of Materials Chemistry* **13** (3):458-469
- Kruse F.E., (1994). Review. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* , **8** (Pt 2):170-83.
- Kurpakus-Wheater M., Kernacki K.A., Hazlett L.D., (2001). Maintaining corneal integrity how the "window" stays clear. *Progress in histochemistry and cytochemistry* **36**:185-259.
- Latour G., Georges G., Siozade-Lamoine L. , Deumié C., Conrath J., Hoffart L., (2010). Light scattering from human corneal grafts: Bulk and surface contribution, *J. Appl. Phys.* **108**(5): 053104; doi.org/10.1063/1.3452334
- Lee K. Y., Mooney D. J., (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.*, **101**, 1869-1879.
- Linsenmayer T.F., Fitch J.M., Gordon M.K., Cai C.X., Igoe F., Marchant J.K., Birk D.E. (1998). Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog Retin Eye Res* **17**:231-265.
- Li F., Carlsson D.J., Lohmann C.P., Suuronen E.J., Vascotto S., Kobuch K., Sheardown H., Munger R., Griffith M., (2003). Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix: corneal implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**:15346-15351.
- Li F., Griffith M., Li Z., Tanodekaew S., Sheardown H., Hakim M., (2005). Recruitment of multiple cell lines by collagen-synthetic copolymer matrices in corneal regeneration. *Biomaterials*, **26**:3093-3104.
- Liu L., Sheardown H. (2005). Glucose permeable poly (dimethyl siloxane) poly (N-isopropyl acrylamide) interpenetrating networks as ophthalmic biomaterials. *Biomaterials* **26**:233-244
- Liu W., Deng C., McLaughlin C. R., Fagerholm P., Lagali N. S., Heyne B., (2009). Collagen-phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes. *Biomaterials*, **30**: 1551-1559.
- Livolant F., Bouligand Y.. (1978). New observations of the twisted arrangement of dinoflagellate chromosomes. *Chromosoma* **68**:21-44

Livolant ... Mottes

- Livolant F., Y. Bouligand Y., (1986). Liquid crystalline phases given by helical biological polymers (DNA, PBLG and xanthan). Columnar textures. *Journal de Physique*, **47** (10):1813-1827.
- Livolant F., (1987). Precholesteric liquid crystalline states of DNA. *Journal de Physique*, **48** (6): 1051-1066.
- Long C.G., Braswell E., Zhu D., Apigo J., Baum J., Brodsky B., (1993). Characterization of collagen-like peptides containing interruptions in the repeating Gly-X-Y sequence. *Biochemistry* **32**(43):11688-95.
- Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoude G.A., Barrandon Y., (2008) Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* **456**: 250-254
- McLaughlin C. R., Acosta M. C., Luna C., Liu W., Belmonte, C., Griffith M., (2010). Regeneration of functional nerves within full thickness collagen-phosphorylcholine corneal substitute implants in guinea pigs. *Biomaterials* **31**:2770-2778.
- Maurice D.M. (1957). The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* **136**:263-286.
- Meek K. M., Leonard D. W. (1993). Ultrastructure of the corneal stroma: a comparative study. *Biophys. J.* **64**:273-280.
- Meek K.M., Newton R.H., (1999). Organization of collagen fibrils in the corneal stroma in relation to mechanical properties and surgical practice. *J Refract Surg* **15**:695–699.
- Meek K.M., Boote C., 2004. The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental Eye Research*, Special issue in honour of David Maurice, **78**:503–512. doi:10.1016/j.exer.2003.07.003
- Meek K.M., Knupp C., (2015). Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research* **49**:1–16. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.001
- Mehta J. S., Futter C. E., Sandeman S. R., Faragher R. G., Hing K. A., Tanner K. E., (2005). Hydroxyapatite promotes superior keratocyte adhesion and proliferation in comparison with current keratoprosthesis skirt materials. *Br. J. Ophthalmol.* **89**:1356-1362.
- Merrett K., Griffith M., Deslandes Y., Pleizier G., Dube M. A., Sheardown H. (2003). Interactions of corneal cells with transforming growth factor beta 2- modified poly dimethyl siloxane surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **67**:981-993.
- Merrett K., Griffith M., Deslandes Y., Pleizier G., Sheardown H. (2001). Adhesion of corneal epithelial cells to cell adhesion peptide modified pHEMA surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **12**:647-671.
- Morishige N., Wahlert A.J., Kenney M.C., Brown D.J., Kawamoto K., Chikama T., Nishida T., Jester J.V., (2007). Second-Harmonic Imaging Microscopy of Normal Human and Keratoconus Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **48**:1087.
- 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
- Mottes M., Gomez Lira M., Zolezzi F, Valli M., Lisi V., Freising P. , (1998). Four new cases of lethal osteogenesis imperfecta due to glycine substitutions in COL1A1 and genes. Mutations in brief no. 152.. *Hum Mutat.* **12**(1):71-72.

Mouton ... Peixoto

- Mouton C., (2002), La greffe endothéliale au centre hospitalier régional et universitaire de Lille : résultats et complications chez nos 11 premiers patients, Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine, Université du droit et de la santé de Lille
- Müller, L.J., Pels, E., Vrensen, G.F.J.M., (2001). The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* **85**:437–443.
- Murthy N.S., (1984). Liquid crystallinity in collagen solutions and magnetic orientation of collagen fibrils, *Biopolymers*, **23** (7):1261–1267.
- Myung D., Duhamel P.E., Cochran J.R., Noolandi J., Ta C.N., Frank C.W., (2008). Development of hydrogel-based keratoprotheses: a materials perspective. *Biotechnol Prog.*, **24**(3):735-41. doi: 10.1021/bp070476n.
- Myung D., Farooqui N., Zheng L. L., Koh W., Gupta S., Bakri A., (2009). Bioactive interpenetrating polymer network hydrogels that support corneal epithelial wound healing. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **90**: 70-81
- Nakamura T., Inatomi T., Sotozono C., Ang L. P., Koizumi N., Yokoi N., (2006). Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology*, **113**:1765-1772
- Neville A. C., Gubb D.C., Crawford R.M., (1976). A new model for cellulose architecture in some plant cell walls, *Protoplasma*, **90**:307-317
- Nishida T., Yasumoto K., Otori T., Desaki J., (1988). The network structure of corneal fibroblasts in the rat as revealed by scanning electron microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science* **29**:1887-1890.
- Nishida K., Yamato M., Hayashida Y., Watanabe K., Maeda N., Watanabe H., Yamamoto K., Nagai S., Kikuchi A., Tano Y., Okano T., (2004). Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface, *Transplantation*, **77**(3):379-385
- Okuda M., Takeguchi M., Tagaya M., Tonegawa T., Hashimoto A., Hanagata, N., Ikoma, T., (2007). Elemental distribution analysis of type I collagen fibrils in tilapia fish scale with energy-filtered transmission electron microscope. *Micron* **40**: 665-668
- Olague-Marchan M., Twining S.S., Hacker M.K., McGrath J.A., Diaz L.A., Giudice G.J., (2000). A disease-associated glycine substitution in BP180 (type XVII collagen) leads to a local destabilization of the major collagen triple helix. *Matrix Biol.* **19**(3):223-33.
- Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S., Ponzin D., McKeon F., De Luca M., (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:3156-3161.
- Peixoto P.D.S., Deniset-Besseau A., Schanne-Klein M.-C., Mosser G., (2011). Quantitative assessment of collagen I liquid crystal organizations: role of ionic force and acidic solvent, and evidence of new phases. *Soft Matter* **7**:11203-11210.
- Peixoto, P.D.S., Deniset-Besseau, A., Schmutz, M., Anglo, A., Illoul, C., Schanne-Klein, M.C., Mosser, G., (2013). Achievement of cornea-like organizations in dense collagen I solutions: clues to the physico-chemistry of cornea morphogenesis. *Soft Matter*, **9**:11241-11248.

Pierschbacher... Sollich

- Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. (1987). Influence of stereochemistry of the sequence Arg–Gly–Asp–Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **262**:17294–17298.
- Pinsky P.M., van der Heide D., Chernyak D., (2005). Computational modeling of mechanical anisotropy in the cornea and sclera, *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, **31**(1), 136-145
- Ponce Marquez S., Martinez V. S., McIntosh A. W., Wang J., Gantxegui N. G., Schein O., (2009). Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* **5**:1839-1847.
- Prockop D.J., Kivirikko K.I., (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Review Biochemistry* **64**:403-434.
- Prockop D.J., Fertala A.(1998). The Collagen Fibril: The Almost Crystalline Structure, *Journal of Structural Biology* **122** (1–2):111-118
- Quantock A.J., Young R.D., (2008). Development of the corneal stroma, and the collagen-proteoglycan associations that help define its structure and function. *Dev Dyn.* **237**(10):2607-2621.
- Radner W., Zehetmayer M., Aufreiter R., Mallinger R., (1998). Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea* **17**:537–543.
- Rama P., Bonini S., Lambiase A., Golisano O., Paterna P., de Luca M., (2001). Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* **72**:1478-1485.
- Reinitzer F.,(1888). Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins, Monatshefte für Chemie. **9**:421-441.
- Ricard-Blum S., Ruggiero F., van der Rest M., (2005). The Collagen Superfamily. *Collagen Topics in Current Chemistry* **247**:35-84.
- Robinson C., (1961). Liquid-Crystalline Structures in Polypeptide Solutions, *Tetrahedron* **13**:219-234.
- Roland J.C., Vian B., (1979). The wall of the growing plant cell: its three dimensional organization, *Int. Rev. Cytol.* **61**:129-166.
- Roth S., Freund I., (1979). Second harmonic generation in collagen. *J. Chem. Phys.* **70**(4):1637-1643.
- Ruberti J.W., Roy A.S., Roberts C.J., (2011). Corneal biomechanics and biomaterials. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **13**:269–295.
- Sandeman S. R., Jeffery H., Howell C. A., Smith M., Mikhalovsky S. V., Lloyd A. W., (2009). The in vitro corneal biocompatibility of hydroxyapatite-coated carbon mesh. *Biomaterials* **30**: 3143-3149.
- Scott J.E., (2007). Chemical morphology: The chemistry of our shape, *in vivo* and *in vitro* J, *Struct Chem*, **18**:257–265.
- Shah J.S., Jayson M.I.V., Hampson W. G. J., (1979). Mechanical Implications of Crimping in Collagen Fibres of Human Spinal Ligaments. *Engineering in Medicine* **8**(2):95-102
- Shapiro M.S., Friend J., Thoft R.A., (1981). Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. *Investigative ophthalmology & visual science* **21**:135-142.
- Sollich P., (1998), Rheological constitutive equation for model of soft glassy materials, *Physical Review E*

- Strampelli, B. (1963). Osteo-odontokeratoprosthesis. *Ann. Ophthalmol. Clin. Ocul.* **89**:1039-1044.
- Strupler M., Pena A.M., Hernest M., Tharaux P.L., Martin J.L., Beaurepaire E., Schanne-Klein M.-C., (2007). Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues, *Opt. Express* **15**: 4054-4065.
- Sweeney D. F., Xie R. Z., Evans M. D., Vannas A., Tout S. D., Griesser H. J., (2003). A comparison of biological coatings for the promotion of corneal epithelialization of synthetic surface in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**:3301-3309.
- Tanaka Y., Baba K., Duncan T.J., Kubota A., Asahi T., Quantock A.J., Yamato M., Okano T., Nishida K., (2011). Transparent, tough collagen laminates prepared by oriented flow casting, multicyclic vitrification and chemical cross-linking. *Biomaterials* **32**(13):3358-3366.
- Teulon C., Tidu A., Portier F., Mosser G., Schanne-Klein M.-C., (2016). *Optics Express* **24**(14):16084-16098
- Teulon C., communication privée (thèse en cours de rédaction, 2016)
- Than M.E., Henrich S., Huber R., Ries A., Mann K., Kühn K., Timpl R., Bourenkov G.P., Bartunik H.D., Bode W., (2002). The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**(10):6607-6612.
- Thomasy S.M., Raghunathan V.K., Winkler, M., Reilly, C.M., Sadeli, A.R., Russell, P., Jester, J.V., Murphy, C.J., (2014). Elastic modulus and collagen organization of the rabbit cornea: Epithelium to endothelium. *Acta Biomater* **10**:785–791.
- Thoft R.A., Friend J., (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative ophthalmology & visual science* **24**:1442-1443.
- Tidu A., Ghoubay-Benallaoua D., Lynch B., Haye B., Illoul C., Allain J.-M, Borderie V.M., Mosser G., (2015). Development of human corneal epithelium on organized fibrillated transparent collagen matrices synthesized at high concentration. *Acta Biomater* **22**:50-58.
- Trinkaus-Randall V., (2000). Cornea. In: Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. (eds.), Principles of Tissue Engineering. San Diego, Academic Press, pp.471–491.
- Ushiki T., (2002) Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint. *Archives of Histology and Cytology*, **65**(2):109-126.
- van Essen T.H., van Zijl L., Possemiers T., Mulder A.A., Zwart S.J., Chou C.H., Lin C.C., Lai H.J., Luyten G.P., Tassignon M.J., Zakaria N., El Ghalbzouri A., Jager M.J.. (2016). Biocompatibility of a fish scale-derived artificial cornea: Cytotoxicity, cellular adhesion and phenotype, and in vivo immunogenicity. *Biomaterials* **81**:36-45.
- Vijayasekaran S., Chirila T.V., Robertson T.A., Lou X., Fitton J.H., Hicks C.R., Constable I.J., (2000). Calcification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea: a 3-month study. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **11**: 599–615.
- Wallace C., Jacob J. T., Stoltz A., Bi J., Bundy K. (2005). Corneal epithelial adhesion strength to tethered protein/peptide modified hydrogel surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **72**:19-24.

- Wenstrup R. J. ., Lever L. W, Phillips C. L., Quarles L.D., (1993). Mutations in the COL1A2 gene of type I collagen that result in nonlethal forms of osteogenesis imperfecta, *American Journal of Medical Genetics*, **45**(2):228–232.
- Wenstrup R.J., Florer J.B., Davidson J.M., Phillips C.L. , Pfeiffer B.J., Diana W. Menezes, Chervoneva I. and Birk D.E. , (2006). Murine Model of the Ehlers-Danlos Syndrome col5a1 haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:12888-12895. doi: 10.1074/jbc.M511528200
- Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay P.M., (2001). Corneal blindness: a global perspective, *Bulletin of the World Health Organization*, **79**:214–221.
- Williams, R.M., Zipfel W.R., Webb W.W., (2005). Interpreting Second-Harmonic Generation Images of Collagen I Fibrils. *Biophysical Journal* **88**:1377-1386. doi:10.1529/biophysj.104.047308
- Wu J.J., Woods P.E., Eyre D.R., (1992). Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem.* **267**(32):23007-14.
- Young B.B., Zhang G., Koch M., Birk D.E., (2002). The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J. Cell. Biochem.* **87**:208-220.
- Zipfel W. R., Williams R., Christie R., Nikitin A., Hyman B., Webb W., (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**:7075-7080.

Annexe 1 : Protocole d'extraction du collagène

A. Prélèvement des tendons dans les queues de rats

L'extraction se fait à partir d'une quarantaine de queues de rats, pas forcément du même type de rats, sous la hotte à flux laminaire. Les queues sont décongelées lentement sur un lit de glace pour limiter les risques de contamination. Une fois souples, les queues sont prêtes pour l'extraction.

Au préalable, il faut avoir préparé environ 2-3 litres de PBS stérile, une solution d'un litre de NaCl 4M et stérilisé le matériel d'extraction (ciseaux, pinces coupe-ongles)

Technique :

- Avec une pince coupe-ongles on se place à 1 cm environ de l'extrémité fine de la queue et on casse la vertèbre
- Sortir les tendons en tirant (doucement) la pince tout en tournant la queue
- Veiller à ne pas amener si possible de vaisseaux sanguins avec les tendons
- Placer les tendons dans un bécher contenant environ 500 mL de PBS stérile et sous agitation
- On recommence l'opération jusqu'à environ 3 centimètres de l'autre extrémité

Lavage des tendons :

- Sortir avec l'aide des pinces les vaisseaux sanguins visibles et autres contaminants tels que les poils. Changer le PBS plusieurs fois afin d'avoir une solution claire.
- Faire plusieurs centrifugations au PBS de sorte que le surnageant soit limpide
- Ensuite, faire une centrifugation au NaCl 4M afin de lyser les déchets cellulaires.
- Faire de nouveau des centrifugations au PBS (5 min chacune, 1500 g) puis à l'eau pour éliminer le sel et les débris cellulaires.

Préparation de la solution de collagène :

- Peser les tendons et les mettre dans un bécher contenant de l'acide acétique et vérifier que le pH vaut 2,5, sinon ajuster avec de l'HCl 1M. NB : 30 grammes de tendons dans 2,5 L.
- Mettre à agiter et laisser le collagène se dissoudre pendant 24h, au-delà il y a risque de détérioration du collagène du fait de la présence de contaminants.

Purification de la solution de collagène :

- Centrifuger la solution à 20 000 rpm pendant 3 heures pour éliminer les agrégats non dissous.
- Récupérer le surnageant et le faire précipiter avec du NaCl 4M de sorte à avoir une solution à 300 mM. Verser le NaCl au goutte à goutte sous agitation. Centrifuger le tout à 20 000 rpm pendant 3 heures et récupérer le surnageant. Cela permet d'éliminer les contaminants qui précipitent par le sel à 300 mM)
- Précipitation du collagène avec NaCl 600 mM (de même, verser au goutte à goutte sous agitation)
- Centrifuger la solution à 4500 rpm dans les bouteilles pendant 45 min à 4°C. Le surnageant doit être limpide, sinon il y a encore du collagène dedans et il faut refaire la centrifugation. Récupérer et rassembler tous les culots (c'est là que se trouve le collagène)
- Solubiliser les culots dans de l'acide acétique 500 mM et équilibrer à pH=2,5. NB : 200 grammes de culots dans 1,8 L qsp donnent une solution à 2-3 mg/mL.
- Effectuer 4 bains de dialyses dans de l'acide acétique 500 mM pour éliminer le sel restants
- Transférer la solution de collagène des boudins dans un bécher et procéder à une dernière centrifugation à 20 000 tours par minute pendant 3h à 4°C pour éliminer les derniers agrégats.

B. Détermination de la concentration en collagène

Déterminer la concentration en collagène revient à déterminer la concentration d'hydroxyproline.

Hydrolyse des échantillons

- Prélever 50 µL de solution de collagène et peser pour connaître précisément le volume. (Faire 3 échantillons)
- Hydrolyser en ajoutant 50 µL d'HCl 6N et placer le tout à l'étuve à 106°C pendant la nuit (Faire attention à bien fermer les échantillons)
- Le lendemain, ouvrir les échantillons dans l'étuve et laisser sécher (il doit rester uniquement une poudre brune)

Dosage de l'hydroxyproline

- Reprendre les échantillons avec 1 mL d'eau distillée et vortexer
- Dosage.
- Mettre à refroidir dans la glace pendant 5 min
- Lecture de la densité optique à 557 nm sur un spectromètre UV-visible
- Calculer la concentration en hydroxyproline sachant qu'il y a 13% (d'où le 7,6) d'hydroxyproline dans une molécule de collagène.

$$- C(\text{collagène}) = \frac{C_{\text{Hydroxyproline}} (\mu\text{g.mL}^{-1}) * 7,6}{m (\text{échantillon collagène})}$$

C. Les réactifs

Tampon de dosage

- Acide acétique monohydraté (0,25 M) 6,25 g
- Acétate de sodium trihydraté (1M) 17,5 g
- Hydroxyde de sodium (0,85 m) 4,25 g
- Acide acétique purex 1,5 mL
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 100 mL
- Ajuster le pH à 6 avec de l'acide acétique pure

Hydroxyproline

Solution mère :

- Hydroxy-L-Proline 20 mg
- H₂O distillée 100 mL

Solution de dosage : solution mère diluée au 1/10

Solution de DMBA

- DMBA 1 g
- Méthyl cellosolve 5 mL

Acide Perchlorique

- Acide perchlorique 65 % 30 mL
- H₂O distillée 70 mL

Solution de chloramine T

- Chloramine T 400 mg
- H₂O distillée 5 mL
- Méthyl cellosolve 7,5 mL
- Tampon de dosage 1,25 mL

Toutes les solutions, hormis l'acide perchlorique et le tampon de dosage, sont à préparer extemporanément.

D. Electrophorèse – Pureté de la solution

Préparation des gels

1 – Gel de migration (10%)

| | |
|--|--------|
| - H ₂ O distillée | 8,1 mL |
| - Tris HCl 1,5 M, pH=8,8 | 5 mL |
| - Acrylamide/Bis 30% | 6 mL |
| - SDS 10% | 200 µL |
| - Persulfate d'ammonium 10% | 100 µL |
| - Temed (à ajouter juste avant de couler le gel) | 10 µL |

2 – Gel de concentration (5%)

| | |
|---|--------|
| - H ₂ O distillée | 5,7mL |
| - Tris HCl 0,5M ; pH=6,8 | 2,5 mL |
| - Acrylamide/Bis 30% | 1,7 mL |
| - SDS 10% | 100µL |
| - Persulfate d'ammonium 10% | 50 µL |
| - Temed (ajouter au moment de l'emploi) | 10 µL |

Montage

- Laver les plaques de verre à l'alcool 70%
- Installer les plaques sur le montage et vérifier que le système est étanche en mettant de l'H₂O distillée entre les plaques.
- Remplir avec le gel de migration jusqu'à environ 5 mm de la ligne verte inférieure à l'aide d'une pipette.
- Ajouter à la propipette et très doucement de l'eau distillée par-dessus jusqu'en haut des plaques (environ 1 mL)
- Attendre la polymérisation du gel (quelques dizaines de minutes, mais cela peut varier)
- Une fois le gel polymérisé, vider l'eau au dessus en retournant le gel.
- Ajouter le gel de concentration jusqu'à 2-3 mm du haut des plaques et insérer le peigne (10 puits) qui permet de faire les puits.

Préparation de la cuve

Transférer les plaques sur le support d'électrophorèse en mettant les puits (petites plaques) vers l'intérieur. Si il n'y a qu'un seul gel, utiliser les plaques en plastiques pour fermer le montage.

Mettre le support dans la cuve et remplir jusqu'en haut des plaques avec du tampon de migration 1X.

Préparation des échantillons et dépôt

- Diluer les échantillons de collagène (dans le même solvant soit de l'acide acétique 500 mM, s'il s'agit de la solution issue de la purification) par exemple 2,5 fois, 5 fois et 10 fois.
- Ces échantillons sont encore dilués de moitié avec le tampon d'échantillon (1 volume d'échantillon et 1 volume de tampon). En général, 10 μ L d'échantillon et 10 μ L de tampon.
- Mettre ces échantillons 5-10 min dans l'eau bouillante
- Laisser refroidir 5 min dans la glace
- Déposer les dans les puits et garder un puits libre pour le marqueur de poids moléculaire.

Migration

- Recouvrir la cuve avec le couvercle et veiller à respecter les polarités et relier les électrodes l'appareil.
- Régler l'appareil sur 80 V. Des bulles doivent apparaître dans le tampon de migration, signe que le courant passe. Rester sur 80 V le temps que les échantillons traversent le gel de concentration et arrivent au gel de migration.
- Une fois les échantillons à la limite entre les deux gels, régler l'appareil sur 160 V
- Arrêter quand tous les échantillons ont atteint le bas du gel.
- Retirer les plaques du support et noter sur un transparent en décalquant le gel le front de migration ainsi que toutes les bandes du marqueur de poids moléculaires.

Coloration

- Démouler les gels et les placer dans des boîtes en plastique avec un couvercle
- Ajouter environ 100 mL (de quoi recouvrir le gel) de bleu de Coomassie.
- Agiter pendant 1h.

Décoloration

Décoloration rapide

- Ajouter 50-100 mL de décolorant rapide après avoir retiré le bleu de Coomassie
- Laisser agiter 1h

Décoloration lente

- Jeter le bleu et ajouter 100 mL de décolorant de conservation
- Agiter une nuit

Réhydratation

- Jeter le décolorant et ajouter 100 mL d'eau distillée pour que les gels, qui se sont contractés à cause de l'alcool présent dans les décolorants, retrouvent leur taille normale.

Réactifs de l'électrophorèse

1. Tris-HCl 1,5 M pH=8,8 : solution prête à l'emploi
2. Tris-HCl 0,5 M pH=6,8 : solution prête à l'emploi
3. SDS 10% : solution prête à l'emploi mais penser à la faire chauffer pour solubiliser les agrégats
4. Persulfate d'ammonium 10% :
 - Persulfate d'ammonium 500 mg
 - H₂O distillée 5 mL
1. Acrylamide Bis 30% : solution prête à l'emploi
2. Temed : prêt à l'emploi
3. Tampon d'échantillon :
 - Tris-HCl 0,5 M pH=6,8 1,25 mL
 - β Mercapto Ethanol 0,45 mL
 - SDS 10% 2 mL
 - Bleu de Bromophénol 0,05%
 - Glycérol 1 mL
 - EDTA 3,72 mg
 - H₂O distillée 5 mL qsp
1. Tampon de migration 10 X :
 - Tris 30 g
 - SDS 10 g
 - Glycine 144 g
 - H₂O 1000 mL qsp
1. Tampon de migration 1X : Tampon 10X dilué 10 fois
2. Bleu de Comassie : prêt à l'emploi
3. Décolorant rapide :
 - Ethanol 400 mL
 - H₂O distillée 500mL
 - Acide acétique 100 mL
1. Décolorant de conservation (lent) :
 - Ethanol 100 mL
 - H₂O distillée 825 mL
 - Acide acétique 75 mL

E. Protocole d'inclusion pour le TEM

Les échantillons doivent être coupés en petits morceaux et rincés à l'eau avant la première fixation de sorte à éliminer toute trace d'ammoniaque. Ensuite les échantillons sont placés dans des salières en verre.

Première fixation au glutaraldéhyde

- Préparer une solution de glutaraldéhyde :
 - Glutaraldéhyde 8% 1 mL
 - Tampon Caco 0,05 M-pH=7,4 2,2 mL
- Ajouter 1 mL de la solution de glutaraldéhyde (de quoi recouvrir les échantillons)
- Laisser 1 heure à 4°C
- Faire 3 lavages de 10 minutes chacun avec une solution de lavage composée de :
 - 1 volume de tampon Cacodylate 0,1 M
 - 1 volume de saccharose 0,6 M

Deuxième fixation : Osmium

- Préparer une solution d'osmium 2% :
 - 1 volume de Tétraoxyde d'osmium 4%
 - 1 volume d'eau distillée
- Ajouter environ 1 mL de la solution dans les salières
- Laisser 1 h dans le frigo CMR
- Faire trois lavages avec la solution de rinçage (10 min par rinçage)

Déshydratation

- Alcool 50 : 5 min
- Alcool 70 : 5 min
- Alcool 95 : 5 min
- Alcool 100 : 2 bains de 10 min
- Alcool 100° + oxyde de propylène (1 volume de chaque)
- Oxyde de propylène 10 min

Imprégnation

- Préparer une solution d'araldite
 - Araldite CY212 20 mL
 - DDSA 22 mL
 - BDMA 1,1 mL
- Oxyde de propylène $\frac{3}{4}$ vol. + Araldite $\frac{1}{4}$ vol. : recouvrir les échantillons et laisser 1 h
- Oxyde de propylène $\frac{1}{4}$ vol. + Araldite $\frac{3}{4}$ vol. : 1 nuit à 4°C.
- Changer les salières
- Araldite : 1 bain d'une heure (utiliser de l'araldite neuve)

- Araldite : 1 bain de 2 heures

Inclusion

- Préparer des « pré-blocs » : remplir, 2 jours avant l'inclusion, les blocs de la plaque d'inclusion à moitié avec de l'araldite. Laisser dans l'étuve à 60°C.
- Placer l'échantillon sur la résine déjà dure, à l'avant du bloc et au milieu.
- Compléter le bloc avec de la résine neuve.
- Mettre à l'étuve pendant 3 jours.

Annexe 2 : Les différents collagènes de la cornée

| | | | |
|------------------------|---|---|--|
| Collagène I | $[\alpha 1(\text{I})]_2 \alpha 2(\text{I})$ | Fibrilles | - stroma lamellaire, - membrane de Bowman - constituant essentiel (20 mg) du collagène cornéen |
| Collagène II | $[\alpha 1(\text{II})]_3$ | Fibrilles | - cornée embryonnaire de poulet |
| Collagène III | $[\alpha 1(\text{III})]_3$ | Fibrilles | - stroma lamellaire, - membrane de Bowman, - membrane de Descemet, - cicatrices |
| Collagène IV | $[\alpha(\text{III})]_3$ | Filaments | - membrane basale épithéliale - membrane de Descemet (ABZ) |
| Collagène IV | $[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV})$ | Filaments | - membrane de Descemet (PNBZ) |
| Collagène V | $[\alpha 1(\text{V})]_2 \alpha 2(\text{V})$ | Fibrilles | - stroma lamellaire, - membrane de Bowman, - jonction entre le stroma et la membrane de Descemet |
| Collagène VI | $\alpha 1(\text{VI}) \alpha 2(\text{VI}) \alpha 3(\text{VI})$ | Filaments, maintien de l'espacement interfibrillaire | - stroma lamellaire, - membrane de Bowman, - plaques d'ancrage |
| Collagène VII | $\alpha 1(\text{VII})_3$ | Filaments | - fibrilles d'ancrage |
| Collagène VIII | $[\alpha 1(\text{VIII})]_2 \alpha 2(\text{VIII})$ | Filaments | - membrane de Descemet (ABZ) |
| Collagène IX | $\alpha 1(\text{IX}) \alpha 2(\text{IX}) \alpha 3(\text{IX})$ | Collagène (filaments) associé aux fibrilles de coll. II, avec triple hélice interrompue, liaison covalente avec chondroïtine sulfatée | - stroma primaire |
| Collagène XII | $[\alpha 1(\text{XII})]_3$ | Collagène (filaments) associé aux hétérofibrilles de collagène I/V, avec triple hélice interrompue, liaison covalente avec la chondroïtine sulfatée | - stroma lamellaire |
| Collagène XVIII | | | - membrane de Descemet |

Table des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1-1 : Les différents types de collagène et leur distribution dans différents tissus (tiré de S. Bancelin, 2013 selon Kadler <i>et al.</i> , 2007 et Prockop <i>et al.</i> , 1995). | 8 |
| Figure 1-2 : La structure du collagène type I en triple hélice, avec la répétition du motif Gly-X-Y (adapté de Hulmes, 2008). | 9 |
| Figure 1-3 : Synthèse du collagène type I. Le clivage des propeptides a lieu en dehors de la cellule. Cela entraîne la perte de la solubilité en milieu physiologique des triples hélices et leur auto-assemblage en fibrille (d'après P. Fratzl, 2008 à gauche et d'après <i>The Art of MBOC³ : The Complete Set of Figures from Molecular Biology of the Cell</i> , Alberts <i>et al.</i> , 1996 à droite) | 10 |
| Figure 1-4 : (a) Représentation schématique d'une fibrille. Le diamètre varie selon les tissus. Des liaisons covalentes stabilisent les fibrilles. (d'après B. Leblanc) (b) Image MET d'une fibrille (photo MET, G. Mosser). | 11 |
| Figure 1-5 : Fibrille observée au TEM (Kadler <i>et al.</i> , 1996) avec la striation caractéristique de 67 nm. | 11 |
| Figure 1-6 : Organisation des fibrilles de collagène dans différents tissus. (a) image au MET de tendons, les fibrilles sont assemblées en fibres dans lesquelles les fibrilles sont parallèles entre elles (D'après Komai <i>et al.</i> , 1991); (b) organisation en contreplaqué dans la cornée (d'après Salvotelli); (c) image MEB du derme (Ushiki <i>et al.</i> , 2002) (Tiré de Bancelin, 2013) | 12 |
| Figure 1-7 : S vaut 1 lorsque toutes les molécules sont alignées et 0 pour un liquide..... | 15 |
| Figure 1-8 : phase nématique. Globalement les molécules sont orientées selon une direction moyenne donnée par le vecteur directeur. | 16 |
| Figure 1-9 : Représentation d'une phase smectique A. Les molécules sont organisées en couches. Au sein d'une couche, elles sont orientées plus ou moins dans une même direction. | 16 |
| Figure 1-10 : Représentation schématique d'une phase smectique C (à gauche) et d'une smectique C* (à droite). Dans cette dernière les molécules sont inclinées par rapport à la perpendiculaire aux couches. Il y a une torsion hélicoïdale d'une couche à l'autre. (Tiré de Fernandes, 2008) | 17 |
| Figure 1-11 : Phase cholestérique. Le vecteur directeur décrit une hélice. Les molécules tournent de façon continue. Sur la figure, l'orientation des molécules varie d'un plan à l'autre avec un angle constant. | 17 |
| Figure 1-12 Représentation schématique d'une organisation cristal-liquide contreplaquée. Au sein d'une même couche les molécules sont alignées. On passe brutalement d'une couche à l'autre. Les molécules d'une couche font un angle de 90° avec les molécules de la couche suivante..... | 18 |
| Figure 1-13 : Phase discotique (d'après Kouwer <i>et al.</i> , 2003) formée par des molécules planes. Les colonnes forment ici un réseau hexagonal. | 19 |
| Figure 1-14 Organisation cholestérique dans les chromosomes de dinoflagellés. En coupe oblique, on remarque la présence caractéristique des arceaux. (Livolant <i>et al.</i> , 1987)..... | 19 |

| | |
|--|----|
| Figure 1-15 : Rotation progressive des couches de fibrilles dans les écailles du coelacanthe (Giraud-Guille, 1978)..... | 20 |
| Figure 1-16 : Représentation schématique d'une coupe oblique du tissu de l'écaille. L'orientation des fibres tourne progressivement d'un plan à l'autre dans le sens des flèches. (Giraud Guille, 1978) | 20 |
| Figure 1-17 : Structure en bandes observée dans une solution d'ADN concentrée. Cette structure évoluerait vers une phase cholestérique par la suite. (Livolant, 1984)..... | 21 |
| Figure 1-18 : Représentation schématique d'un œil humain..... | 22 |
| Figure 1-19 : Aspect histologique de la cornée, avec ses cinq couches principales. Le stroma représente 90% de l'épaisseur cornéenne et est majoritairement composé de collagène de type I organisé en contreplaqué..... | 25 |
| Figure 1-20 : L'épithélium, première couche de la cornée. On voit les différentes couches cellulaires de l'épithélium avec leurs formes caractéristiques. La couche superficielle est composée de cellules ailées (image tirée de la thèse d'E. Collomb, 2010) | 26 |
| Figure 1-21 : Localisation du limbe et de la conjonctive par rapport à la cornée. Au niveau de la couche basale du limbe se trouvent les cellules souches pour la régénération de l'épithélium. Il y a à ce niveau une structure en niche avec une vascularisation (image tirée de la thèse d'E. Collomb, 2010). | 27 |
| Figure 1-22 : Les cellules souches limbiques se trouvent au niveau de ce qu'on appelle les palissades de Vogt. Quand elles se divisent, elles forment des cellules transitoires (TAC) qui migrent vers la cornée (image tirée de la thèse d'E. Collomb, 2010)..... | 28 |
| Figure 1-23 : Organisation en contreplaqué du collagène I chez le Lapin (A) vue par HRMac. Au sein de chaque lamelle les fibrilles vont à peu de chose près dans la même direction, mais changent brutalement, d'environ 90° dans la lamelle adjacente (B, C) Les domaines organisés font entre 10 et 120 µm. Le stroma postérieur comporte des domaines organisés plus grands que le stroma antérieur (B) Les lamelles ne sont pas toutes parallèles à la courbure. Elles ont en moyenne une petite largeur de 10 µm et une épaisseur de 2 µm. A : tiré de Thomasy <i>et al.</i> , 2013 ; B : Aptel <i>et al.</i> , 2010 ; C : Pinsky <i>et al.</i> , 2005..... | 29 |
| Figure 1-24 : Cellules endothéliales, avec leur forme hexagonale caractéristique (d'après Allouch-Nahmias <i>et al.</i> , 2011)..... | 31 |
| Figure 1-25 : Schéma simplifié de la formation embryonnaire de la cornée (figure tirée de C. Mouton, 2012)..... | 32 |
| Figure 1-26 : Photographie de la cornée marquée avec la technique de l'acétylcholinestérase. Un nerf provenant du réseau sous-épithélial (signalé par la tête de flèche seule) pénètre dans la membrane de Bowman et donne naissance à d'autres nerfs dans le stroma (A). Le point de perforation est indiqué par la flèche. En B on peut voir les multiples « branches » se formant juste avant que le nerf ne perfore la membrane. Les points de contact des nouveaux branchements avec la membrane sont indiqués par les têtes de flèche (figures tirées et adaptées de Al Aqaba <i>et al.</i> , 2010)..... | 34 |
| Figure 1-27 : Photomicrographie de l'ensemble de la cornée (montage de 37 images) où l'on peut voir tous les sites de perforation, marqués par points noirs, de la membrane de | |

| | |
|--|----|
| Bowman. Ces sites sont préférentiellement localisés dans la zone périphérique de la cornée. On dénombre une trentaine de sites dans la partie centrale contre plus de 100 dans la zone périphérique (figure tirée de Al Aqaba <i>et al.</i> , 2010)..... | 34 |
| Figure 1-28 : Schéma de la Boston Kpro [®] | 39 |
| Figure 1-29 : Caractérisation structurale de 20 couches de collagène après un traitement de clarification optique. Coupes des couches stratifiées de collagène avec les directions parallèles (A, C, E, et G) et perpendiculaires (B, D, F et H). A et B : image en lumière polarisée de coupes gelées. C et D : imagerie SEM. E et F : images TEM à faible grandissement. G et H images TEM à fort grandissement (figure tirée de Tanaka <i>et al.</i> , 2010)..... | 44 |
| Figure 1-30 : A et B : schéma expliquant la formation des couches de fibrilles orientées par flow-casting. (A : laminage parallèle, B : laminage orthogonal). C : la taille est contrôlée par le nombre de couches ajoutées. (Tanaka <i>et al.</i> , 2010)..... | 44 |
| Figure 1-31 : Réticulation du collagène durant la vitrification. On voit l'impact du temps de vitrification sur la microstructure. (Calderon-Colon <i>et al.</i> , 2012)..... | 45 |
| Figure 1-32 : Prolifération des cellules épithéliales des deux côtés de l'écaille, (van Hessen <i>et al.</i> , 2016)..... | 46 |
| Figure 2-1 : Gel d'électrophorèse en condition. Les bandes les plus marquées sont caractéristiques du collagène. Les deux bandes du haut correspondent aux dimères β_{11} et β_{12} et les deux bandes les plus importantes aux brins α_1 et α_2 | 51 |
| Figure 2-2 : Cartographie des conditions physico-chimiques testées. | 53 |
| Figure 2-3 (a) moule en verre respectant la courbure de la cornée; (b) cornée moulée en forme de disque, classiquement utilisée pour les mesures de transparence et la culture cellulaire..... | 54 |
| Figure 2-4 : Représentation schématique d'une micro-cellule. Le collagène est injecté continuellement à travers un capillaire pendant plusieurs jours. La solution se concentre à l'interface avec l'air par évaporation du solvant. On observe alors la formation des phases cristal-liquides dont l'organisation diffère suivant les conditions physico-chimiques. | 54 |
| Figure 2-5 : Ellipsoïde des indices | 58 |
| Figure 2-6 : Exemple de phase cristal-liquide formée dans une microcellule et observée au microscope à lumière polarisée. Cette phase est obtenue avec la condition 23. Elle est dite en contreplaqué puisque l'alternance de bandes brillantes et sombres signifie la présence d'angles importants (proche de 90°) entre deux couches de molécules. | 59 |
| Figure 2-7 : Image OCT d'une matrice avec cellules stromales intégrées. On peut voir une image de la matrice dans toute son épaisseur. | 59 |
| Figure 2-8 : a) Lorsque l'on excite une molécule symétrique, la fréquence du rayonnement d'excitation est égale à celle du rayonnement diffusé : c'est la diffusion de Rayleigh. Si la molécule est non centro-symétrique on a à la fois la diffusion de Rayleigh et la diffusion harmonique (rayonnement de fréquence double) à forte intensité d'excitation..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Figure 2-9 : Représentation d'une liaison peptidique. Ces liaisons sont à l'origine du signal SHG de la molécule de collagène (tiré de Bancelin, 2013). | 61 |
| Figure 2-10 : L'origine du signal SHG dans le collagène est liée à l'hyperpolarisabilité β des liaisons peptidiques présentes dans la molécule de collagène. Ainsi le signal SHG va dépendre de l'organisation de ces liaisons dans le volume d'excitation donc de l'organisation 3D des triples hélices. La triple hélice présente une symétrie C^∞ . (C. Teulon, 2016)..... | 62 |
| Figure 2-11 : Exemple de phase cristal-liquide formée par le collagène dans une microcellule et observé par SHG en polarisation circulaire. La condition physico-chimique utilisée est la condition 23, qui donne un contreplaqué. On retrouve ici la structure observée en lumière polarisée avec une alternance de franges sombres et brillantes caractéristiques du contreplaqué..... | 63 |
| Figure 2-12 : la SHG en polarisation consiste à exciter l'échantillon avec un faisceau polarisé linéairement dont on fait varier l'angle θ . A : Représentation schématique du montage expérimental. L'angle de polarisation θ de l'excitation est contrôlé grâce à deux lames d'ondes achromatiques. Le champ exciteur E^ω est focalisé à travers un objectif. Le rayonnement de second harmonique est détecté vers l'avant avec un condenseur ($NA \approx 1$) et le signal 2PEF vers l'arrière à travers l'objectif focalisant. B : zoom schématique du volume d'excitation. La flèche rose donne l'orientation moyenne des triples hélices présentes dans le volume d'excitation. (x,y,z) est le repère correspondant avec l'axe x dans la direction moyenne des triples hélices. (XYZ) est le repère du laboratoire. La polarisation incidente E^ω est représentée par la flèche rouge et est supposée être contenue dans le plan de l'image (XY) . C: C'est un diagramme d'intensité donnant une statistique d'orientation des molécules de collagène au sein du volume focal. (D'après C. Teulon, 2016) | 64 |
| Figure 2-13 : Les deux angles φ et ψ décrivent l'orientation des molécules dans le volume d'excitation : l'orientation dans le plan de l'image φ ; et l'orientation hors du plan donnée par ψ qui peut être mesurée à partir de deux paramètres, l'intensité SHG moyenne I_{mean} et le paramètre d'anisotropie ρ | 65 |
| Figure 2-14 Calibration de la concentration en collagène en fonction du signal 2PEF détecté (tiré de Teulon, 2016) | 67 |
| Figure 2-15 : Interaction électron matière et poire d'interaction | 68 |
| Figure 2-16 : Energie associée aux différents types d'interaction | 69 |
| Figure 2-17 : Colonne d'un microscope électronique à transmission..... | 71 |
| Figure 2-18 : Image TEM d'une matrice fibrillée synthétisée avec la condition 23. On voit une alternance de zones où les fibrilles sont dans le plan de l'image avec des zones où elles sont perpendiculaires à ce même plan. Cela est proche d'une structure en contreplaqué de type « cornée ». | 73 |
| Figure 2-19 : Principe de la cryofracture (d'après E. Jaspard, 2007). | 74 |
| Figure 2-20 Représentation schématique du système utilisé. L'angle β est égal à 0,04 radian. | 77 |

| | |
|---|----|
| Figure 2-21 : Schéma de la suture de l'explant limbique sur les matrices de collagène fibrillées. Les cellules partent de l'explant pour coloniser la surface de la matrice ou la membrane amniotique (tiré de Tidu <i>et al.</i> , 2015)..... | 79 |
| Figure 2-22 : Microphotographie de cellules souches stromales qui sont regroupées en sphères. En fonction du milieu on peut les différencier en kératocytes (qui apparaissent sur cette image, ils sont de forme allongée) ou bien en cellules endothéliales..... | 80 |
| Figure 2-23 : Caractérisation des cellules souches stromales (SSC) par immunofluorescence. Bmi1 est un marqueur du noyau des cellules souches ; la nestin est un marqueur des cellules souches neuronales et les SSC proviennent de la crête neurale ; le keratocan est un marqueur des cellules souches keratocytaires ; pax6 est le gène maître du développement de l'œil..... | 81 |
| Figure 2-24 : Coupe histologique d'une matrice avec cellules à la surface observée au microscope. On voit notamment l'épithélium stratifié à la surface de la matrice..... | 83 |
| Figure 3-1 : (a) Photo d'une microcellule en cours de remplissage. (b) Image en lumière polarisée (objectif x10) montrant l'apparition de la phase cristal-liquide sur un des bords de la microcellule. La zone noire correspond à une zone où la solution de collagène n'est pas assez concentrée pour s'organiser en phase cristal-liquide..... | 88 |
| Figure 3-2 : Evolution de I_{mean} et ρ par rapport à l'angle hors plan ψ , soit sans focalisation (tracés noirs en pointillés obtenus par calculs analytiques) ou bien avec une forte focalisation (courbes rouge -SHG à l'avant- et orange -SHG vers l'arrière- obtenues par simulations numériques, NA=1,2). $\rho(\psi)$ est tracé pour $\rho_b=1,36$. (d'après C. Teulon <i>et al.</i> , 2016)..... | 92 |
| Figure 3-3 : Organisation en contreplaqué (Plywood-like). Cette structure est composée de couches de quelques μm de triples hélices alignées dans une même direction (flèches rouges). Deux couches consécutives ont des directions perpendiculaires. L'axe directeur, en orange, est perpendiculaire aux couches. On suppose que cet axe est contenu dans le plan (XZ) de sorte à avoir des angles centrés autour de 90° . (a) C'est le cas le plus simple avec l'axe directeur selon X et les directions des couches suivant Y et Z. (b) deux angles sont nécessaires pour décrire l'orientation 3D : l'angle α que fait l'axe directeur par rapport au plan de l'image, et l'angle β qui est l'angle que font les couches par rapport à cet axe ($\beta=0$ quand une couche est selon Y). (C. Teulon <i>et al.</i> , 2016)..... | 94 |
| Figure 3-4 : Images P-SHG théoriques obtenues à partir des calculs analytiques pour diverses orientations de la structure en contreplaqué : (a) $\alpha=0^\circ$ et $\beta=0^\circ$, (b) $\alpha=0^\circ$ et $\beta=20^\circ$, (c) $\alpha=20^\circ$ et $\beta=0^\circ$, (d) cas particulier $\alpha=20^\circ$ et $\beta=45^\circ$. Pour les trois premières orientations (a, b, c) les projections sont représentées dans le plan de l'image (XY) et dans le plan (XZ). Pour les deux dernières (d1 et d2) les projections ne sont pas dans le même plan et ne peuvent donc pas être représentées. Ici, l'angle φ est défini par rapport à l'axe X. La comparaison des orientations pour un même angle α , c'est-à-dire (a) et (b) ou (c) et (d) montre que les trois paramètres d'intérêts ont moins de contraste quand $\beta \neq 0^\circ$. (Tiré de C. Teulon <i>et al.</i> , 2016)..... | 95 |
| Figure 3-5 : Images des zones organisées dans l'épaisseur de 11 microcellules différentes (barre d'échelle 10 μm). On observe à gauche les images à une profondeur donnée | |

| | |
|--|-----|
| présentant une organisation. Sur la droite on observe les coupes transversales. L'épaisseur de la zone organisée est de quelques dizaines de μm | 97 |
| Figure 3-6 : Imagerie multi-photon sur une solution de collagène de condition 23 organisée en microcellule. En A on voit le signal SHG montrant l'organisation de type contre-plaqué. (B) profil d'intensité de la SHG de la région indiquée en jaune sur (A). En (B) la ligne rouge correspond à un fit par un ensemble de Lorentziennes. En vert on a chaque lorentzienne séparément. | 98 |
| Figure 3-7 : Images P-SHG des phases cristal-liquides du collagène. (a) et (b) regroupement d'images obtenues par P-SHG pour deux microcellules de la même condition physico-chimique (10 mM AA-0,3 mM HCl) conduisant à la formation d'une phase cristal-liquide nématique en contreplaqué. La concentration en collagène a été mesurée par fluorescence excitée à deux photons (2PEF) et était comprise entre 300 et 1000 mg/mL dans les zones observées. <i>Echelle : 10 μm</i> . (c) Images zoomées de la zone entourée en jaune en (b). (d) Profils des trois paramètres P-SHG le long des lignes jaunes tracées en (c). (e) Valeur absolue de l'angle hors plan ψ déduit de I_{mean} et ρ . La réorientation observée montre que les triples hélices tournent autour de l'axe directeur (Tiré de C. Teulon <i>et al.</i> , 2016). | 99 |
| Figure 3-8 : Observation de solutions fibrillées (condition 23) extraites des microcellules et préparées pour le cryo-SEM-FEG. On observe l'organisation des fibrilles dans la microcellule avec des changements de directions clairs (A et B). En C et D on observe des pics qui sont la signature de fibrilles transverses. | 103 |
| Figure 3-9 : Images TEM de deux microcellules obtenues avec la condition 23. On observe l'alternance de fibrilles parallèles entre elles longitudinalement et de fibrilles perpendiculaires. Les zones de fibrilles parallèles entre elles font environ 200-300 nm de large. | 103 |
| Figure 3-10 : Coupe semi-fine d'une solution (10 mM AA-0,3 mM HCl) de condition 23 fibrillée en microcellule et observée en lumière polarisée. | 104 |
| Figure 3-11 : Image en lumière polarisée à gauche et en SHG au centre et à droite pour des coupes semi-fines réalisées à partir de solutions concentrées de condition 23 en microcellules. | 104 |
| Figure 3-12 : Profil en intensité obtenu avec une coupe semi-fine (condition 23). Le profil est caractérisé par la présence de doubles pics qui se répètent tous les 6,5 μm . La largeur d'un double-pic est elle de 2 μm | 105 |
| Figure 3-13 : Images à trois grossissements différents de coupes semi-fines réalisées à partir de solutions concentrées en microcellule (condition 5) donnant une organisation cholestérique. | 105 |
| Figure 3-14 : Variation de G' et G'' en fonction de la contrainte (en haut) et variation de G' et G'' en fonction de la fréquence pour un niveau de contrainte de 10 Pa (en bas) | 106 |
| Figure 3-15 : Variation de G' et G'' en fonction de la contrainte (à gauche) et variation de G' et G'' en fonction de la fréquence pour un niveau de contrainte de 10 Pa | 107 |

| | |
|--|-----|
| Figure 3-16 A gauche : variation de G' et G'' en fonction de la contrainte. A droite : variation de G' et G'' en fonction de la pulsation ω pour différents niveaux de contrainte, 180 Pa et 10 Pa. | 108 |
| Figure 3-17 : Variation de G' (à gauche) et de G'' (à droite) en fonction du temps de relaxation pour une contrainte de 10 Pa. Les temps indiqués sont les temps depuis la mise en place de l'échantillon. | 108 |
| Figure 3-18 : Comparaison des évolutions de G' et G'' pour les trois conditions testées en fonction de la pulsation ω | 109 |
| Figure 3-19 : Modules linéaires G' (continu) et G'' (tireté) pour différentes température de bruit ; tirée de Sollich <i>et al.</i> , 1997. | 112 |
| Figure 4-1 : Transparence maximale de l'ensemble des conditions physico-chimiques testées pour des matrices à 90 mg/mL. On voit la transparence en fonction des concentrations en acide acétique et en acide chlorhydrique. La taille des cercles est proportionnelle à la transparence. | 117 |
| Figure 4-2 : Valeurs de transparence obtenues par d'autres groupes développant des cornées artificielles. On notera que la valeur maximale obtenue avec nos matrices est supérieure avec 97,3 % à 90 mg/mL. | 118 |
| Figure 4-3 : Evolution de la transparence en fonction de la concentration pour différentes conditions physico-chimiques. | 119 |
| Figure 4-4 : Transparence de matrices synthétisées avec la condition 7 soumises à différents temps de fibrillogénèse. Les barres sombres représentent la transparence entre 380 et 780 nm et la valeur moyenne est donnée par la barre claire. | 120 |
| Figure 4-5 : Evolution de la transparence en fonction du temps pour des matrices synthétisées avec la condition 23. La transparence varie les deux premières semaines après la synthèse puis atteint un plateau et reste stable durant des mois. | 121 |
| Figure 4-6 : Photographie d'une matrice (condition 23) transparente plusieurs mois après sa synthèse. | 122 |
| Figure 4-7 : Evolution de la transparence pour différentes matrices à 60 et 90 mg/mL. Cette augmentation est calculée en référence à la transparence de chaque matrice le jour de la synthèse. | 122 |
| Figure 4-8 : Courbes de transparence en fonction de la longueur d'onde pour trois matrices de condition 23, 20 jours après leur fabrication. | 123 |
| Figure 4-9 : Mesures de transparence (entre 380 et 780 nm) pour des matrices synthétisées avec la condition 1 à 60 et 90 mg/mL, en présence et en l'absence de cellules. | 124 |
| Figure 4-10 : Caractérisation des matrices par MET. On voit l'organisation des fibrilles de collagène à différentes concentrations : 15 mg/mL (A et E), 30 mg/mL (B et F), 60 mg/mL (C et G) et enfin 90 mg/mL (D et H). Les images E, F, G et H sont des zooms des zones éclaircies des images A, B, C et D respectivement. Dans tous les cas on distingue la striation caractéristique de 67 nm des fibrilles de collagène. Le diamètre des fibrilles apparaît compris entre 20 et 50 nm. La densité de fibrilles augmente avec la | |

| | |
|---|-----|
| concentration. A 90 mg/mL, on voit apparaître une organisation des fibrilles avec une alternance de zones où elles sont transverses puis longitudinales. (Tidu <i>et al.</i> , 2015)... | 125 |
| Figure 4-11 : Observation TEM d'une matrice opaque à 90 mg/mL. On remarque les amoncellements en forme d'étoile des fibrilles..... | 126 |
| Figure 4-12 A : Solution de collagène dans l'acide acétique 500 mM fibrillée, à 90 mg/mL. B : solution fibrillée de condition 23, à 90 mg/mL. Les gels sont en présence de cellules endothéliales HUVECs. (En rose : fibres d'actines ; en orange : noyaux cellulaires) On voit, en jaune, les fibrilles beaucoup plus grosses dans l'acide acétique 500 mM..... | 127 |
| Figure 4-13 : Observation TEM de matrices synthétisées avec la condition 23. La structure en contreplaqué n'est pas aussi nette qu'en microcellule mais on distingue des alternances de zones avec des fibrilles transverses et longitudinales..... | 128 |
| Figure 4-14 Définition du pas du contreplaqué | 129 |
| Figure 4-15 : Observation TEM de membranes amniotiques..... | 129 |
| Figure 4-16 : Caractérisation mécanique des matrices synthétisées avec la condition 1. Le module d'Young et la force à la rupture augmentent avec la concentration en collagène. On passe de 77 ± 3 kPa à 30 mg/mL à 576 ± 32 kPa à 90 mg/mL pour le module d' Young. L'élongation à la rupture diminue de 30 mg/mL à 90 mg/mL en passant de $99 \pm 2\%$ à $54 \pm 3\%$. * (respectivement **) signifie $p < 0,05$ (respectivement $p < 0,01$). .. | 130 |
| Figure 4-17 : Essai de traction sur les matrices issues de la condition 23 à la même concentration de 90 mg/mL. | 131 |
| Figure 4-18 : Mesures mécaniques sur des matrices synthétisées avec la condition 23 à 60 mg/mL (en rouge) et à 90 mg/mL (en vert et en bleu) provenant de purifications différentes de collagène..... | 132 |
| Figure 5-1 : Microscopie à contraste de phase montrant la croissance des cellules épithéliales à la surface des matrices (A et B) de collagène depuis l'explant (indiqué par l'étoile)..... | 138 |
| Figure 5-2 : Cette figure montre une coupe semi-fine réalisée à partir de matrices avec cellules fixées et incluses dans de la résine pour la microscopie électronique. Ici, la matrice est concentrée à 90 mg/mL. On peut observer un épithélium stratifié d'une épaisseur de 50 à 100 μm . (Tidu <i>et al.</i> , 2015)..... | 138 |
| Figure 5-3 : Analyse TEM des matrices avec cellules. A : Deux couches de cellules (C1 et C2) sont présentes sur la matrice (M). B : Des interdigitations, caractéristiques des cellules épithéliales de cornées peuvent être vues entre deux cellules adjacentes (C2 et C2'). C et D : des séries de desmosomes sont observées le long de la jonction entre deux cellules. (Tidu <i>et al.</i> , 2015)..... | 139 |
| Figure 5-4 : Croissance clonale des cellules épithéliales dissociées en présence de feeders 3T3. La forme caractéristique des cellules épithéliales est retrouvée aussi bien sur la matrice de collagène (A) que sur la membrane amniotique (B)..... | 140 |
| Figure 5-5 : immunomarquages des cellules épithéliales sur les matrices de collagène. Des marquages cytoplasmiques ont été réalisés avec des anticorps anti-cytokeratine et anti-vimentine. Le noyau a été marqué avec un anticorps anti-p63 α . Barre d'échelle : 200 μm . (Tidu <i>et al.</i> , 2015)..... | 140 |

| | |
|--|-----|
| Figure 5-6 : PCR quantitative des cellules épithéliales limbiques cultivées sur les matrices de collagène et les membranes amniotiques (9 répliques). La membrane amniotique est considérée comme le contrôle avec un niveau d'expression du transcrit (i.e. $2^{-\Delta\Delta CT}$) fixé à 1 pour les 3 ARNm recherchés. (Tidu <i>et al.</i> , 2015) | 141 |
| Figure 5-7 : Observation au FFOCM de la croissance des cellules à la surface des matrices (A) et sur une membrane amniotique (B). 4 à 5 couches cellulaires sont observées sur les deux supports. | 142 |
| Figure 5-8 : Formation des colonies par les cellules dissociées des matrices et des MA. A. Image de cellules formant des colonies en culture. B. Les cellules des colonies montrent un marquage positif pour $\Delta Np63\alpha$. C. Peu de cellules sont CK3 positives dans les colonies. D. La différence dans le pourcentage de CFE n'est pas significative entre les matrices et les MA. | 143 |
| Figure 5-9 : Analyse du phénotype des cellules. A. Immunomarquages réalisés sur des échantillons de matrices et de membranes amniotiques fixées dans la paraffine. Les cellules qui colonisent les deux supports présentent un marquage positif pour la CK3. B. L'ARN a été extrait des cellules présentes sur les matrices et les membranes amniotiques. Les expressions de CK3 et de p63 α sont significativement plus élevées avec les matrices qu'avec les membranes amniotiques..... | 144 |
| Figure 5-10 : Observation de matrices de condition 23 avec cellules épithéliales. Barre d'échelle : 200 nm..... | 145 |
| Figure 5-11 Représentation schématique du second procédé. Une suspension cellulaire est placée au dessus d'une solution de collagène à 40 mg/mL. En centrifugeant à 1500 rpm à 4°C, les cellules rentrent dans le gel et ne semblent pas passer la membrane du tube de concentration. Le collagène, lui, se concentre légèrement..... | 147 |
| Figure 5-12 : Représentation schématique du quatrième procédé : une suspension cellulaire est placée au dessus d'une solution concentrée à 60 mg/mL de collagène, elle-même au dessus d'une lamelle de verre. On rajoute éventuellement du collagène au-dessus (à droite sur le schéma). Ensuite on vient appuyer légèrement avec une autre lamelle de verre afin de faire rentrer les cellules dans la solution. On essaie de garder une épaisseur suffisamment faible pour que la transparence soit maintenue..... | 147 |
| Figure 5-13 : Dapi sur des gels (environ 30 mg/mL) de collagène à trois temps différents. Les noyaux des cellules sont en blanc. Il semble y avoir de façon systématique plus de noyaux à J14. | 148 |
| Figure 5-14 : A gauche : coupe histologique sur laquelle on peut observer la localisation, principalement à la surface, des kératocytes et image OCT illustrant le même phénomène à J7. A J14, à droite, on observe une prolifération de cellules à la surface et l'image OCT dans l'épaisseur laisse suggérer la présence de cellules à l'intérieur à proximité immédiate de la surface. | 149 |
| Figure 5-15 : FFOCT vu de dessus et en coupe du gel avec les kératocytes. Les quelques cellules encapsulées survivent dans le gel ce qu'on peut voir sur la coupe histologique. | 150 |

| | |
|---|-----|
| Figure 5-16 : Immunomarquages (J7) sur des matrices réalisées selon le troisième procédé avec kératocytes intégrés. En vert apparaît le collagène, en rouge la vimentine, signe du bon phénotype exprimé par les cellules, et en bleu les noyaux..... | 151 |
| Figure 5-17 : A gauche : FFOCT vu de dessus et en coupe et coupe histologique au milieu du gel. On voit clairement sur la coupe histologique la présence interne des cellules à J7. On voit également la présence de bon nombre de cellules à la surface qui prolifèrent. A J14 la FFOCT en coupe témoigne (longues striations plus claires) d'une prolifération à l'intérieur de la matrice des kératocytes..... | 151 |
| Figure 5-18 : Immunomarquages sur des matrices avec kératocytes, réalisées selon le quatrième procédé. On voit en rouge la vimentine et en bleu le Dapi. Les cellules expriment le bon phénotype dans toute l'épaisseur de la matrice..... | 152 |
| Figure 5-19 : Immunomarquages réalisés sur une vraie cornée avec en vert la matrice extracellulaire et en bleu le noyau des cellules stromales..... | 152 |
| Figure 5-20 : Vue de dessus (A) et en coupe (B) d'un gel à 90 mg/mL de la condition 23 avec les HUVECs. Le cytoplasme est marqué à la phalloïdine (en vert) et les noyaux en rouge. Les gels ont été observés sur un microscope à fluorescence en sortant les gels des puits..... | 154 |
| Figure 5-21 : Gel à 3mg/mL dans la condition acide acétique 500 mM (A) et dans la condition 23 (B). On note la colonisation non homogène des matériaux dans ses conditions..... | 155 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 2-1 : Conditions expérimentales. Ensemble des conditions physico-chimiques testées. Les concentrations des acides sont en mM. Le pH indiqué est celui des solutions de dialyse c'est-à-dire les solutions contre lesquelles la solution de base obtenue après purification est dialysée..... | 52 |
| Tableau 3-1 : Conditions étudiées et présentées dans ce chapitre | 88 |
| Tableau 3-2 : Images en lumière polarisée de phases cristal-liquides de collagène dans des conditions physico-chimiques offrant des matrices transparentes. Dans le cas des conditions 22, 23 et 24 on obtient une phase proche du contreplaqué alors que pour les autres conditions (seules les conditions 2 et 5 sont présentées ici), nous avons observé des phases cholestériques. | 90 |
| Tableau 3-3 : Valeurs des pré-facteurs G_0' et G_0'' , et des puissances α et β selon l'équation 3-6..... | 109 |